

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**MICROORGANIZACIÓN DE LA CORTEZA
TRANSENTORRINAL Y DE LA CORTEZA ENTORRINAL
HUMANA EN CONDICIONES NORMALES Y EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Marta Domínguez Álvaro

Tesis Doctoral

2020

Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**MICROORGANIZACIÓN DE LA CORTEZA
TRANSENTORRINAL Y DE LA CORTEZA ENTORRINAL
HUMANA EN CONDICIONES NORMALES Y EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Memoria presentada por

Marta Domínguez Álvaro

para optar al grado de Doctora en Neurociencia

Realizada en el Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales (CSIC-UPM)

bajo la dirección del la Dra. Lidia Alonso Nanclares y el Dr. Javier DeFelipe Oroquieta

Fdo.: Lidia Alonso Nanclares

Fdo.: Javier DeFelipe

Agradecimientos

En primer lugar, comenzaré dando las gracias a Javier, por haberme dado la oportunidad de entrar al laboratorio y comenzar la carrera investigadora en un lugar como este. Muchísimas gracias también a Mi Lidia, por enseñarme todo lo que me has enseñado durante estos años, y por ser mi guía durante todo el camino. Ha sido una maravilla contar con una jefa como tú, que ha estado siempre que lo he necesitado, en los buenos y en los malos momentos, tanto a nivel profesional como a nivel personal. Tengo que añadir un agradecimiento especial por todo el tiempo invertido en tu despacho en conversaciones profundas sobre la vida en general y el buceo en particular.

Además de a Javier y Lidia como jefes, me gustaría también dar las gracias al resto de la gente del laboratorio que me ha acompañado durante todo este tiempo: Lorena, Carmen, Miriam, Ana, Isa, Asta, Mamen, Sandra, Débora, las dos Dianas, las dos Lauras, Ruth, Gonzalo, Alberto, Ángel, Silvia, Yago, Javi y Paula (que pena que no hayas llegado antes). En especial, me gustaría reconocer a Pilar todo su esfuerzo y apoyo; a Rodri, darle las gracias por transmitirme esa pasión por la microscopía electrónica y dedicar su tiempo a enseñarme lo maravillosa que puede llegar a ser esta técnica; a Lidia peque, por todos sus consejos y por estar siempre dispuesta a ayudar, pase lo que pase (grandísimo equipo el de Las Martas y Las Lidias); y a Nico, por mostrarme día a día su ilusión por la ciencia. También, me gustaría dar las gracias a aquellos que ahora mismo no están en el laboratorio, pero con los que he pasado momentos importantes y han sido cómplices de todas las conversaciones durante las comidas, tan necesarias a veces para desconectar de la vida: Álex, Guille, Andrea y mi Patri (ay, mi Patri, cuánto te he echado de menos desde que te has ido del laboratorio). Finalmente, haré una mención especial a mis Martas, dos grandes amigas además de magníficas compañeras de trabajo. A Marta T, mi compañera de habitación, muchísimas gracias por todo el tiempo compartido fuera del trabajo, especialmente, en conciertos, viajes y buceos varios. Porque los autocuidados contigo son cuidados de una amiga de verdad. A Marta M, por encontrarnos y abrirme un nuevo camino inmejorable. Tendría muchísimas cosas que decirte y agradecerte, así que resumiendo malamente, tra tra, mil gracias por ser mi gran apoyo en la vida.

De toda la gente que he conocido durante estos años de tesis, voy a mencionar a algunas personas que por unas cosas u otras se han convertido en personas importantes para mí: Gomer, Laura y Andresin, que han sido un gran apoyo en todo momento. Emilio y Las Hurdes, una combinación perfecta, sobre todo en los días malos.

Antes de llegar al laboratorio, tuve la suerte de cruzarme con tres señoras fetén: Paula, Roberto y Elena. Todavía no sé quién de nosotros cuatro es el gafe del grupo, pero lo que sí se, es que esa mala suerte añade un punto extra en todos nuestros viajes. Muchas gracias por esos momentos de risas en las salas de cine de Madrid, que tanto me han servido para desconectar. Si en algún momento la ciencia nos va mal, siempre nos podremos dedicar a ser críticos de cine.

También me gustaría mencionar a las supervivientes del equipo gamba, mis grandes amigas de la carrera Alba, Ana, Celia y Sara. Estudiar la carrera de Biología fue algo muy bonito, pero compartirlo con vosotras fue incluso mejor. Siempre me acuerdo de mi madre diciéndome: “Marta, aprovecha los años de carrera, que son los mejores y luego los vas a echar de menos”, y qué razón tenía.

Muchísimas gracias chicas, por todos los momentos que hemos vivido juntas y por todos los que seguimos viviendo a día de hoy :)

No puedo olvidarme del grupo de amigos que me ha acompañado desde que tengo uso de razón, mis amigos del cole: Pilar, Bea, Sara, Maru, Clara, Nieves y Edu. Son muchísimos todos los momentos que hemos vivido juntos, teniendo en cuenta que nos conocemos desde los cinco años. Como no puedo mencionar todo lo que significa para mí que forméis parte de mi vida, simplemente deciros que estoy muy orgullosa de poder decir que sois mis amigos.

Para finalizar, me gustaría agradecer a mi familia el apoyo que me ha dado siempre, y me sigue dando, no solo a nivel profesional, sino también a nivel personal, especialmente a mi yaya y a mi madre, mis dos referentes en la vida.

A mis yayos, Josefina y Paco

A mis padres, María y Mario

ÍNDICE

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	7
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	13
1. Corteza cerebral	13
1.1. Aspectos generales	13
1.2. Lóbulo Temporal Medial	13
1.2.1. Corteza Transentorrinal	13
1.2.1.1. Localización	13
1.2.1.2. Citoarquitectura	15
1.2.1.3. Conectividad	17
1.2.1.4. Funciones	17
1.2.2. Corteza Entorrinal	20
1.2.2.1. Localización	20
1.2.2.2. Citoarquitectura	20
1.2.2.3. Conectividad	21
1.2.2.4. Funciones	22
2. Organización sináptica de la corteza cerebral	22
2.1. Sinapsis corticales	22
2.1.1. Sinapsis eléctricas	22
2.1.2. Sinapsis químicas	23
2.1.2.1. Tipos de sinapsis químicas	24
2.1.2.2. Forma y tamaño de las sinapsis	24
2.1.2.3. Localización de las sinapsis	25
2.2. Elementos postsinápticos	26
2.2.1. Principales elementos postsinápticos: espinas dendríticas	26
2.2.1.1. Aspectos generales	26

2.2.1.2. Morfología y funcionalidad de las espinas dendríticas	27
2.2.1.3. Composición de las espinas dendríticas	28
2.3. Estudio tridimensional de la organización sináptica cortical	28
3. Enfermedad de Alzheimer	29
3.1. Definición y aspectos generales	29
3.2. Sintomatología y deterioro cognitivo	30
3.3. Alteraciones histopatológicas	31
3.3.1. Ovillos neurofibrilares	32
3.3.2. Placas seniles	34
3.3.3. Relación entre la patología amiloide y la neurofibrilar	35
3.4. Alteraciones de la conectividad sináptica	37
3.5. Diagnóstico y Tratamiento	39
II. OBJETIVOS	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. Preparación del tejido	47
1.1. Obtención del tejido	47
1.2. Procesamiento del tejido para inmunohistoquímica	47
1.3. Procesamiento del tejido para microscopía electrónica	49
2. Microscopía óptica	49
2.1. Estimación de la fracción de volumen de los elementos corticales	49
2.2. Estimación del encogimiento del tejido	51
3. Microscopía electrónica	52
3.1. Microscopía electrónica tridimensional (FIB/SEM)	52
3.2. Análisis sináptico tridimensional	52
3.3. Morfología sináptica: Superficie Sináptica de Aposición	53
3.4. Determinación de elementos postsinápticos	53
3.5. Distribución tridimensional de la sinapsis	55
3.6. Estimación de la fracción de volumen mitocondrial	56
4. Análisis estadístico	56
IV. RESULTADOS	61

1. Estudio histopatológico	61
1.1. Análisis histopatológico y grosor cortical	61
1.2. Fracción de volumen de los elementos corticales	61
2. Estudio ultraestructural del neuropilo	62
2.1. Densidad sináptica	62
2.1.1. Capa II de la CTE	62
2.1.2. Capa II de la CE	63
2.1.3. Capa III de la CE	66
2.2. Proporción de sinapsis excitadoras e inhibitoras	66
2.3. Distribución sináptica espacial tridimensional	66
2.4. Fracción de volumen mitocondrial	70
3. Estudio ultraestructural de las características morfológicas de las sinapsis	71
3.1. Tamaño sináptico: superficie sináptica de aposición	71
3.1.1. Capa II de la CTE	71
3.1.2. Capa II de la CE	72
3.1.3. Capa III de la CE	73
3.2. Morfología sináptica: forma de las sinapsis	73
3.2.1. Capa II de la CTE	73
3.2.2. Capa II de la CE	75
3.2.3. Capa III de la CE	78
3.3. Tamaño y morfología sináptica	79
3.3.1. Capa II de la CTE	79
3.3.2. Capa II de la CE	79
3.3.3. Capa III de la CE	80
4. Estudio de la distribución de las sinapsis en el neuropilo	83
4.1. Proporción y frecuencia de las sinapsis en los elementos postsinápticos	83
4.1.1. Capa II de la CTE	84
4.1.2. Capa II de la CE	89
4.1.3. Capa III de la CE	92
4.2. Tamaño y elementos postsinápticos	95
4.2.1. Capa II de la CTE	96

4.2.2. Capa II de la CE	96
4.2.3. Capa III de la CE	97
V. DISCUSIÓN	101
1. Estudio histopatológico	101
1.1. Cambios corticales relacionados con la enfermedad de Alzheimer: atrofia y pérdida neuronal	101
2. Estudio ultraestructural del neuropilo	102
2.1. Cambios sinápticos relacionados con la enfermedad de Alzheimer	102
2.1.1. Variabilidad interindividual	104
2.2. Distribución sináptica espacial tridimensional	106
3. Estudio ultraestructural de las características morfológicas de las sinapsis	106
3.1. Tamaño sináptico: superficie sináptica de aposición	107
3.2. Morfología sináptica	107
3.2.1. Forma y tamaño de las sinapsis	107
3.2.2. Cambios de morfología sináptica en la enfermedad de Alzheimer	109
4. Estudio de la distribución de las sinapsis en el neuropilo	110
4.1. Proporción y frecuencia de las sinapsis en los elementos postsinápticos	110
4.2. Reorganización de los elementos postsinápticos en la enfermedad de Alzheimer	112
5. Comentarios finales	113
VI. CONCLUSIONES	117
VII. BIBLIOGRAFÍA	121
VIII. ANEXO 1: Tablas suplementarias	135
IX. ANEXO 2: Artículos de investigación	165

ABREVIATURAS

APP/PS1: Proteína precursora amiloide/presenilina-1, por sus siglas en inglés *Amyloid Precursor Protein/ Presenilin-1*

A β : péptido β -amiloide

CA1-CA3: Campos Amónicos (*Cornus Ammonis*)

CaCl₂: Cloruro cálcico

CE: Corteza entorrinal

CPR: Corteza perirrinal

CSR: Aleatoriedad espacial completa, por sus siglas en inglés *Complete Spatial Randomness*

CTE: Corteza transentorrinal

EA: Enfermedad de Alzheimer

EspINA: *Espina Interactive Neuron Analyzer*

FIB: Haz de iones de galio, por sus siglas en inglés *Focus Ion Beam*

GABA: Ácido gamma-aminobutírico

GD: Giro dentado

KS: Kolmogorov-Smirnov test

KW: Kruskal -Wallis test

LTM: Lóbulo temporal medial

LTP: Potenciación a largo plazo, por sus siglas en inglés *Long-Term Potentiation*

MW: Mann-Whitney test

NFTs: Ovillos neurofibrilares, por sus siglas en inglés *Neurofibrillary Tangles*

OsO₄: Tetróxido de osmio

PB: Tampón fosfato, por sus siglas en inglés *Phosphate Buffer*

PHF-tau_{AT8}: Proteína tau hiperfosforilada en el epítipo Ser¹⁹⁹⁻²⁰²

PHF-tau_{PHF1}: Proteína tau hiperfosforilada en el epítipo Ser³⁹⁶

PSD: Densidad postsináptica, por sus siglas en inglés *Post Synaptic Density*

SA: Sinapsis asimétrica

SD: Desviación estándar, por sus siglas en inglés *standard deviation*

SEM: Microscopio electrónico de barrido, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscope*

SS: Sinapsis simétrica

SAS: Superficie sináptica de aposición, por sus siglas en inglés *Synaptic Apposition Surface*

Sem: Error estándar de la media, por sus siglas en inglés *standard error of the mean*

V_v: Fracción de volumen

3D: Tridimensional

χ^2 : Test de chi cuadrado

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Delimitación de las estructuras del LTM realizada por Brodmann en 1909 (arriba) y por von Economo en 1925 (abajo)	14
Figura 2. Delimitación de las estructuras del LTM realizada por Insausti y Amaral (2012)	15
Figura 3. Secciones coronales de la formación del hipocampo humano	16
Figura 4. Sección coronal de la CTE para ilustrar la principal característica citoarquitectónica de la misma.....	17
Figura 5. Secciones coronales de la CTE y la CE humana de un sujeto control (AB2).....	18
Figura 6. Esquema de las principales conexiones intrínsecas y extrínsecas de la formación del hipocampo	19
Figura 7. Esquema de cada una de las capas que forman la CE	21
Figura 8. Esquema de los dos principales tipos de sinapsis transmisión de la información en el sistema nervioso.	23
Figura 9. Fotografía de microscopía electrónica de dos sinapsis de la capa III del neocórtex temporal humano	24
Figura 10. Representación esquemática de la morfología de las uniones sinápticas	25
Figura 11. Dibujos realizados por Santiago Ramón y Cajal mostrando la existencia de las espinas dendríticas	27
Figura 12. Imágenes de Alois Alzheimer y de la paciente Auguste D	30
Figura 13. Preparaciones histológicas de Santiago Ramón y Cajal (Legado Cajal, Instituto Cajal) donde se muestran ovillos neurofibrilares (A-F) e “hilos” en el neuropilo (G-I) en la neocórtex y en el hipocampo	32
Figura 14. Esquema de la patología neurofibrilar observada en la formación del hipocampo y en la neocórtex temporal adyacente	33
Figura 15. Esquema del patrón de distribución de los ovillos neurofibrilares propuesto por Braak y Braak (1991)	34
Figura 16. Preparaciones histológicas de placas seniles teñidas con el método de plata reducida (A-C) y dibujos (D-F) de placas seniles realizados por Santiago Ramón y Cajal (Legado Cajal, Instituto Cajal).....	35

Figura 17. Esquema del patrón de distribución de las placas seniles propuesto por Braak y Braak (1991)	36
Figura 18. Esquema del patrón de distribución de las placas seniles propuesto por Thal <i>et al.</i> , (2002)	36
Figura 19. Microfotografía de una sección semifina (2 μ m) de la CE humana	50
Figura 20. Fotografía de un corte semifino (2 μ m) teñido con azul de toluidina de un sujeto control (AB2) ilustrando la estimación de la fracción de volumen de los diferentes elementos corticales mediante el método de Cavalieri.	51
Figura 21. Serie de imágenes del neuropilo de la capa II de la CTE obtenidas con el microscopio FIB/SEM procedentes de una muestra de un sujeto con EA (IF6).....	54
Figura 22. <i>Screenshot</i> de la interface del software EspINA	55
Figura 23. Estimación mediante el método de Cavalieri de la fracción de volumen ocupada por las mitocondrias en el neuropilo	56
Figura 24. Gráficos de la fracción de volumen ocupada por los elementos corticales en la capa II de la CTE y en las capas II y III de la CE, en el grupo control y en el grupo con EA.....	63
Figura 25. Gráficos de las densidades sinápticas medias de la capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE, en el grupo control y en el grupo con EA	64
Figura 26. Análisis de la distribución espacial sináptica 3D de un sujeto control y un sujeto con EA en la capa II de la CTE	67
Figura 27. Análisis de la distribución espacial sináptica 3D de un sujeto control y un sujeto con EA en la capa II de la CE	68
Figura 28. Análisis de la distribución espacial sináptica 3D de un sujeto control y un sujeto con EA en la capa III de la CE	69
Figura 29. Gráficos de la fracción de volumen de neuropilo ocupada por las mitocondrias en la capa II de la CTE y en las capas II y III de la CE, en el grupo control y en el grupo con EA	70
Figura 30. Gráficos de la distribución de frecuencias del área y perímetro de la SAS de las SA en la capa II de la CTE y en las capas II y III de la CE	71
Figura 31. Gráficos de la proporción de SA y SS en función de la categoría morfológica en la capa II de la CTE (A y B) y en las capas II (C y D) y III (E y F) de la CE, tanto en el	

grupo control como en el grupo con EA	76
Figura 32. Proporción de SA y SS maculares, perforadas, herraduras y fragmentadas en el grupo control y en el grupo con EA de la capa II de la CTE (A) y de las capas II (B) y III (C) de la CE	77
Figura 33. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa II de la CTE en función de la categoría morfológica, en el grupo control y en el grupo con EA	82
Figura 34. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa II de la CE en función de la categoría morfológica, en el grupo control y en el grupo con EA	82
Figura 35. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa III de la CE en función de la categoría morfológica, en el grupo control y en el grupo con EA	84
Figura 36. Serie de imágenes del neuropilo humano de la capa II de la CTE de un sujeto con EA (IF1) obtenidas con el microscopio FIB/SEM	86
Figura 37. Representación de la distribución de SA (en verde) y SS (en rojo) en espinas y tallos dendríticos en la capa II de la CTE (A y B) y en las capas II (C y D) y III (E y F) de la CE, tanto en el grupo control (izquierda) como en el grupo con EA (derecha)	87
Figura 38. Representación de sinapsis únicas y múltiples sinapsis establecidas sobre la misma cabeza de una espina dendrítica en la capa II de la CTE (A y B) y en las capas II (C y D) y III (E y F) de la CE, tanto en el grupo control (izquierda) como en el grupo con EA (derecha)	88
Figura 39. Proporción de SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas, cuellos de espinas dendríticas y tallos dendríticos en la capa II de la CTE (A y B) y en las capas II (C y D) y III (E y F) de la CE, tanto en el grupo control (izquierda) como en el grupo con EA (derecha)	90
Figura 40. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa II de la CTE en función del elemento postsináptico, tanto en el grupo control y en el grupo con EA	97
Figura 41. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa II de la CE en función del elemento postsináptico, tanto en	

el grupo control y en el grupo con EA	98
Figura 42. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa III de la CE en función del elemento postsináptico, tanto en el grupo control y en el grupo con EA	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cambios neuropatológicos producidos en la EA categorizados según la “Escala ABC”	38
Tabla 2. Escala ABC de decisión de probabilidad de diagnóstico de la EA	39
Tabla 3. Información clínica y neuropatológica de los casos de estudio	48
Tabla 4. Fracción de volumen ocupada por los elementos corticales de la capa II de la CTE y las capas II y III de la CE, y grosor cortical, en el grupo control y en el grupo con EA	62
Tabla 5. Datos acumulados obtenidos del análisis de la ultraestructura del neuropilo de la capa II de la CTE y las capas II y III de la CE, en el grupo control y en el grupo con EA	65
Tabla 6. Área (nm^2) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y la SS de capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE, en el grupo control y en el grupo con EA	72
Tabla 7. Proporción de sinapsis maculares, perforadas, herradura y fragmentadas en la capa II de la CTE y en las capas II y III de la CE, en el grupo control y el grupo con EA	74
Tabla 8. Área (nm^2) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS maculares, perforadas, herradura y fragmentadas de la capa II de la CTE, en el grupo control y el grupo con EA	80
Tabla 9. Área (nm^2) y perímetro (nm) de la SAS de las sinapsis maculares, perforadas, herradura y fragmentadas de la capa II de la CE, en el grupo control y el grupo con EA	81
Tabla 10. Área (nm^2) y perímetro (nm) de la SAS de las sinapsis maculares, perforadas, herradura y fragmentadas de la capa III de la CE, en el grupo control y el grupo con EA	83
Tabla 11. Proporción de SA y SS establecidas en cabezas de espinas dendríticas, cuellos de espinas dendríticas, tallos dendríticos sin espinas y tallos dendríticos con espinas en la capa II de la CTE y en las capas II y III de la CE, en el grupo control y el grupo con EA	85
Tabla 12. Área (nm^2), perímetro (nm) y curvatura (ratio) de la SAS de las sinapsis establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y tallos dendríticos en la capa II de la CTE, en el grupo control y el grupo con EA	94
Tabla 13. Área (nm^2), perímetro (nm) y curvatura (ratio) de la SAS de las sinapsis establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y tallos dendríticos en la capa II de la CE, en el grupo control y el grupo con EA	95
Tabla 14. Área (nm^2), perímetro (nm) y curvatura (ratio) de la SAS de las sinapsis establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y tallos dendríticos en la capa III de la CE,	

en el grupo control y el grupo con EA	96
Tabla 15. Resumen comparativo sobre el patrón de distribución sináptica en los diferentes elementos postsinápticos obtenido en el presente estudio y en diversas especies y regiones corticales	111

RESUMEN

En la enfermedad de Alzheimer (EA) la pérdida sináptica en el lóbulo temporal medial (LTM) ha sido postulada como el sustrato principal del déficit cognitivo inicial observado en los pacientes con dicha enfermedad. El objetivo principal de la presente tesis doctoral es describir la ultraestructura detallada de dos regiones corticales en donde comienzan a aparecer los cambios patológicos en la EA: la corteza transentorrinal (CTE) y la corteza entorrinal (CE). La importancia de este estudio radica en que conocer las alteraciones sinápticas en las primeras regiones corticales afectadas por la EA es crucial para entender mejor el progreso y los mecanismos responsables de la misma. Además de proporcionar datos sobre la EA, desentrañar la organización sináptica en condiciones normales es fundamental para conocer mejor la microorganización del cerebro humano.

Para alcanzar el objetivo principal, se ha realizado un estudio cuantitativo del número y distribución de las sinapsis del neuropilo de la capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE humana, así como de las características morfológicas de las mismas, y su distribución en los diferentes elementos postsinápticos. Se han utilizado técnicas estereológicas y de microscopía electrónica tridimensional (3D) en muestras humanas de sujetos sin alteraciones neurológicas y psiquiátricas aparentes (controles) y de sujetos diagnosticados de EA. Los resultados obtenidos muestran que, en condiciones normales, la mayoría de las sinapsis (92-96%) son de tipo excitador (sinapsis asimétricas (SA)), siendo además estas sinapsis más grandes que las de tipo inhibitor (sinapsis simétricas (SS)). La mayoría de las sinapsis presentan una morfología macular (65-80%), y son de menor tamaño. Las SA tienen preferencia por establecerse en las cabezas de las espinas dendríticas, mientras que las SS tienen preferencia por los tallos dendríticos. Además, las SS presentan preferencia por una morfología en herradura.

En las muestras procedentes de los pacientes con EA se encontró una reducción del grosor cortical y de la fracción cortical ocupada por neuronas, una disminución de la densidad sináptica, así como cambios morfológicos y de distribución en los elementos postsinápticos.

Así, la presente tesis doctoral representa el primer análisis exhaustivo realizado mediante microscopio electrónico 3D de la organización sináptica del cerebro humano y sus alteraciones en la EA a nivel ultraestructural. Los resultados obtenidos pretenden contribuir a una mejor comprensión de la relación entre las alteraciones de los circuitos sinápticos y el deterioro cognitivo en la EA.

I. INTRODUCCIÓN

1. CORTEZA CEREBRAL

1.1. Aspectos generales

La corteza cerebral humana no se distribuye de forma homogénea a lo largo de toda su extensión, pudiéndose diferenciar tres tipos principales de corteza: isocorteza, aloccorteza y perialocorteza. La distinción entre los tres tipos de corteza está basada principalmente en la citoarquitectura de las mismas, así como en diferencias morfológicas y funcionales. Atendiendo a estas diferencias, la isocorteza o neocorteza está constituida por seis capas, y englobaría por ejemplo las cortezas de asociación. La aloccorteza o arquicorteza está constituida por tres capas y se correspondería con la corteza olfatoria y el hipocampo. Finalmente, la perialocorteza constituiría una corteza de transición entre la isocorteza y la aloccorteza, presentando características intermedias entre ambas. Estaría formada por seis capas y se correspondería con la corteza entorrinal (CE). Además, a continuación de la CE, se dispone una zona de transición entre la isocorteza temporal y la perialocorteza entorrinal que se corresponde con una proisocorteza de seis capas y que es la corteza perirrinal (CPR; áreas 35 y 36 de Brodmann; Insausti *et al.*, 2017).

Este trabajo está centrado en el estudio microanatómico de la corteza transentorrinal (CTE)/perirrinal y la CE, dos regiones corticales que forman parte del lóbulo temporal, concretamente del lóbulo temporal medial (LTM), y que serán detalladas a continuación.

1.2. Lóbulo Temporal Medial

El lóbulo temporal humano está involucrado en funciones cerebrales superiores y ha sido relacionado con varias enfermedades neurológicas. Anatómicamente, el lóbulo temporal se puede dividir en una parte lateral y una parte medial, que difieren en organización y función. Por otra parte, diversas enfermedades afectan de forma selectiva a regiones concretas del lóbulo temporal (Ding *et al.*, 2009). El LTM está constituido por varias regiones: la amígdala, el hipocampo —incluyendo el giro dentado (GD) y subículo— y las cortezas adyacentes, como son la CPR y la CE (DeFelipe *et al.*, 2007; Insausti *et al.*, 1998; Van Hoesen, 1995). Como veremos en el apartado 3.2, tradicionalmente se han atribuido los primeros síntomas de pérdida de memoria presentes en los pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) con la degeneración de las estructuras del LTM (Serrano-Pozo *et al.*, 2011).

1.2.1. Corteza transentorrinal

1.2.1.1. Localización

La CTE es una corteza en forma de C localizada en el LTM y considerada como una zona de transición entre la isocorteza temporal y la perialocorteza entorrinal (Braak y Braak, 1985; Braak *et al.*, 1996). Anatómicamente, la CTE se sitúa principalmente alrededor de los surcos rinal y colateral del lóbulo temporal, sobre la parte anterior del giro parahipocampal. Lateralmente, limita en su parte anterior con el surco rinal, y en su parte posterior con el surco colateral. Posteriormente, el límite se establece por

una pequeña hendidura en el giro parahipocampal. Sin embargo, estos bordes van a depender de la profundidad que presenten el surco rinal y el surco colateral, resultando en una topografía que es única de cada individuo (Braak *et al.*, 1996; Ding y Van Hoesen, 2010; Insausti *et al.*, 1998; Taylor y Probst, 2008; Van Hoesen, 1995). Además de la variabilidad presente entre individuos, la delimitación de la CTE ha generado controversia en la literatura a lo largo de los años. Inicialmente, en 1909 Brodmann dividió la región medial del lóbulo temporal humano en una parte situada medialmente que denominó área 35 o perirrinal y una región situada más lateralmente que denominó área 36 o ectorrinal (Figura 1).

Sin embargo, Brodmann no hizo ninguna diferenciación de estas dos regiones a lo largo del eje rostro-caudal del LTM. En 1925 von Economo y Koskinas dejaron de usar la denominación numérica de Brodmann, y delimitaron la región medial del lóbulo temporal en una parte rostral denominada TG y dos regiones caudales denominadas TH y TF (Figura 1). En 1975 Van Hoesen y Pandya retomaron la nomenclatura numérica de Brodmann y denominaron a la corteza situada en el lateral del surco rinal como área 35 o CPR. Posteriormente, en 1985 Braak y Braak acuñaron el término de CTE para denominar a la región cortical de transición entre la isocorteza temporal y la perialocorteza entorrinal, siendo algo sinónimos los términos CTE y área 35. Seguidamente, en 1987 Insausti *et al.*, retomaron la nomenclatura numérica de Brodmann y diferenciaron a nivel rostral en el LTM una región más medial correspondiente con el área 35 y una región situada más lateralmente que se

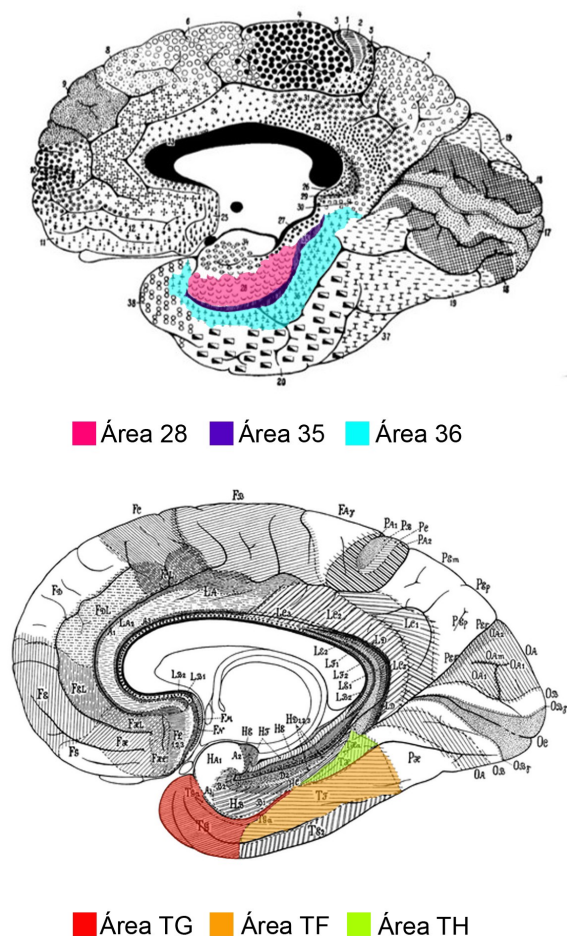


Figura 1. Delimitación de las estructuras del LTM realizada por Brodmann en 1909 (arriba) y por von Economo en 1925 (abajo).

correspondería con el área 36, constituyendo ambas regiones la CPR (Figura 2). A nivel caudal, estas regiones presentarían características citoarquitectónicas diferentes, denominándose en este caso cortezas parahipocampales (las cuales se corresponderían con las áreas TH y TF previamente definidas por von Economo). Finalmente, otros autores como Suzuki y Amaral (1994) han mantenido la agrupación del área 35 y 36 como CPR, en vez de diferenciar área 35 y 36 como CPR y corteza ectorrinal, respectivamente (Augustinack *et al.*, 2013; Suzuki y Amaral, 2003).

Aunque la CTE no está considerada como un área definida en la nomenclatura de Brodmann forma parte del área 35, la cual constituye junto con el área 36 la CPR.

Así, en este estudio hemos adoptado la nomenclatura de CTE, haciendo referencia a la parte más medial o área 35 de Brodmann en niveles rostrales o anteriores del LTM (Figura 3).

1.2.1.2. Citoarquitectura

Desde un punto de vista citoarquitectónico, la principal característica de la CTE es que las células de las capas III y V se mezclan y descienden oblicuamente hasta la capa II de la CE, formando una capa de neuronas característica de esta región (Figura 4; Braak y Braak, 1985; Braak *et al.*, 1996; Ding y Van Hoesen, 2010; Taylor y Probst, 2008). La capa II del área 35 en humanos es una capa de células fina e irregular; la capa III alterna columnas de células grandes y pequeñas. En su parte más profunda, la capa III se compone de grandes neuronas piramidales que constituyen una capa única y característica de esta región. La capa IV es acelular, mientras que la capa V se compone principalmente de células piramidales altamente teñidas. Finalmente, la capa VI se compone de una mezcla de células piramidales más pequeñas y células fusiformes (Figura 5A-B; Ding *et al.*, 2009).

Específicamente, en el área 35 en humanos se pueden diferenciar unas características únicas que permiten su distinción: (i) la capa IV es acelular; (ii) las capas II y III presentan numerosas neuronas inmunoreactivas para calbindina, y, relativamente pocas neuronas inmunoreactivas para la parvalbúmina; (iii) la capa III es la primera en

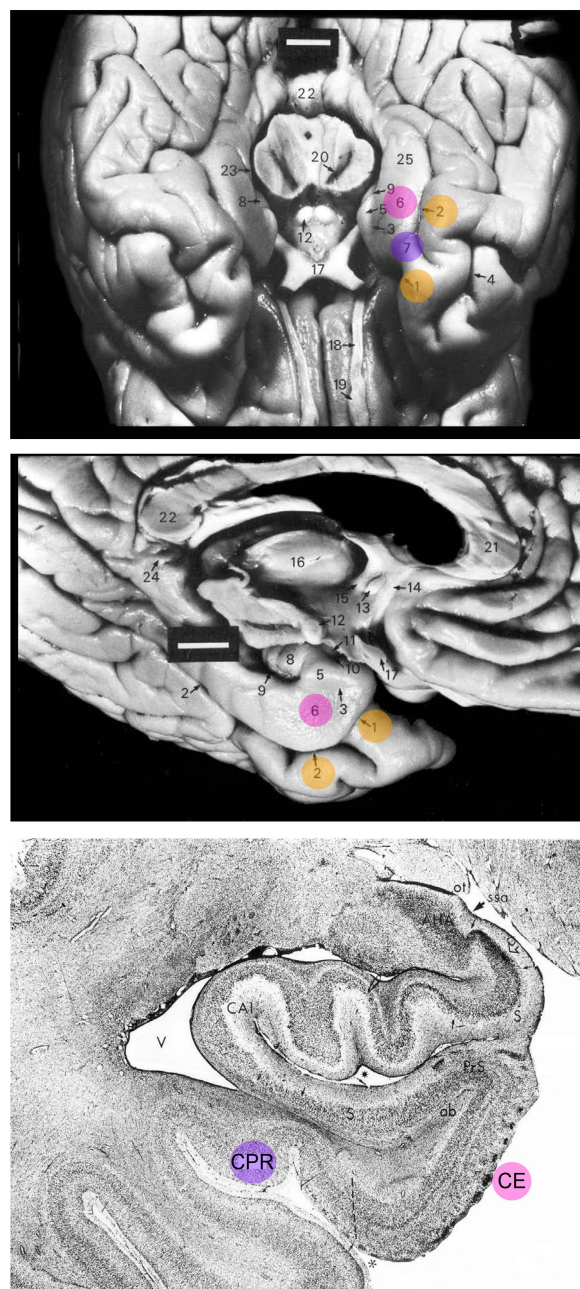


Figura 2. Delimitación de las estructuras del LTM realizada por Insausti y Amaral (2012). Arriba se muestra una visión ventral del cerebro humano después de quitar el tronco del encéfalo y el cerebelo. En medio se muestra una visión ventromedial del lóbulo temporal humano del mismo cerebro después de ser seccionado por la línea media. Abajo se muestra un corte coronal de la formación del hipocampo y las cortezas adyacentes. En naranja se muestran los surcos rinal (1) y colateral (2); en rosa se muestra la CE; en morado se muestra la CPR. Modificado de Insausti y Amaral, 2012.

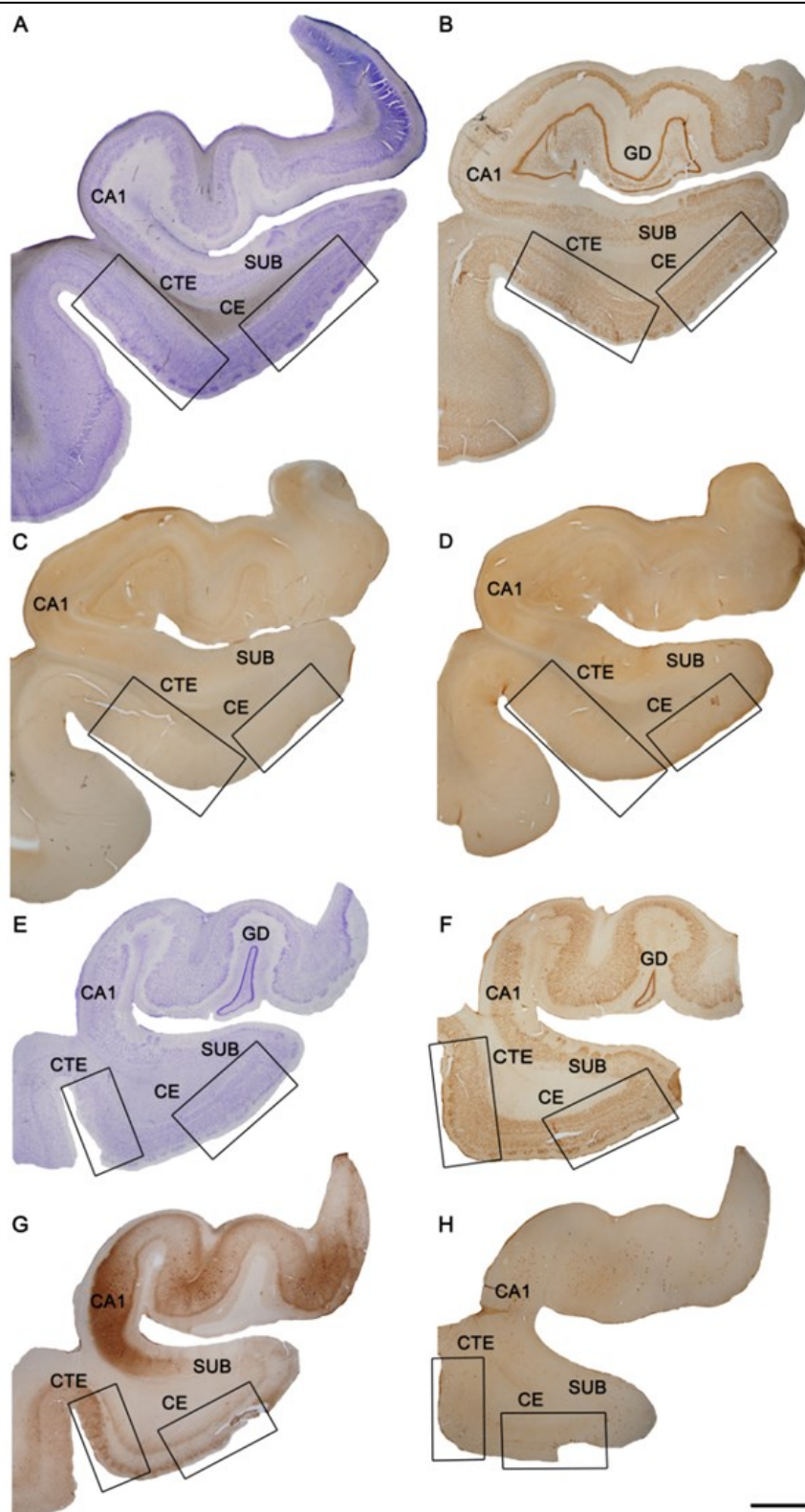


Figura 3. Secciones coroneales de la formación del hipocampo humano. Las secciones muestran diferentes marcadores: Nissl (A y E), anti-NeuN (B y F), anti-PHF-Tau_{AT8} (C y G) y anti-A β (D y H). Las secciones A-D proceden de un sujeto control (AB2), donde se puede observar la ausencia de marcas histopatológicas características de las EA. Las secciones E-H proceden de un sujeto con EA (IF1), donde se puede observar la presencia de neuronas inmunoreactivas para PHF-Tau_{AT8} (G) y placas de péptido A β (H). Las regiones de interés en este estudio (CTE y CE) han sido indicadas con un recuadro. Barra de escala (en H): 3mm. SUB: subículo. Tomada de Domínguez-Álvarez *et al.*, 2018.

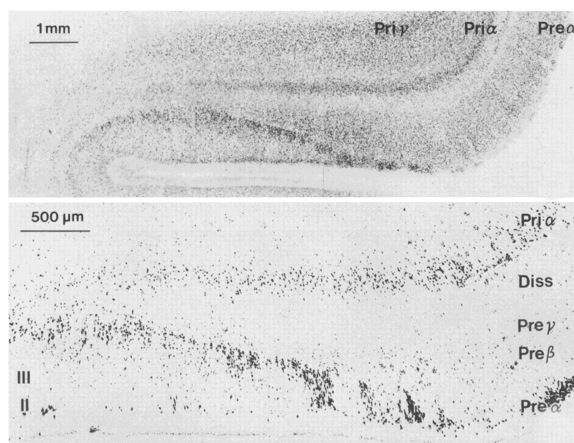


Figura 4. Sección coronal de la CTE para ilustrar la principal característica citoarquitectónica de la misma. Se puede observar como las células de las capas III y V de la CTE se funden y se orientan oblicuamente hacia la capa II (Pre- α) de la CE, formando una capa oblicua de neuronas. Modificada de Braak y Braak, 1985.

presentar patología de tau en sujetos con EA; (iv) las capas II y III presentan una organización columnar que es más evidente en las regiones cercanas a la CE (Ding y Van Hoesen, 2010).

1.2.1.3. Conectividad

Estudios de conectividad realizados en rata y mono han mostrado que la CPR es una zona de convergencia de información que establece interconexiones tanto con estructuras subcorticales, así como con diferentes áreas de asociación. En primer lugar, la CPR se conecta con otras estructuras del LTM, siendo éstas en orden decreciente del número relativo de conexiones: la CE, las cortezas parahipocampales, la amígdala y el hipocampo. En segundo lugar, la CPR está conectada con diferentes áreas corticales de asociación, como la corteza visual, insular, temporal, cingular y orbitofrontal (Suzuki y Amaral, 1994a; Suzuki y Naya,

2014). Una de las principales conexiones recíprocas de la CPR con otras estructuras del LTM es la que establece con la CE: las fibras procedentes de la CPR terminan principalmente en las capas superficiales I-III de la CE, así como en la capa V; mientras que las proyecciones que se originan principalmente en la capa V de la CE terminan en las capas II y V-VI de la CPR (Suzuki y Amaral, 1994b; Suzuki y Naya, 2014). Estas fuertes conexiones hacen de la CPR una corteza única, ocupando una posición estratégica donde la información sensorial converge con información procedente de otras estructuras relacionadas con la memoria, produciéndose así en esta zona una integración de distintos tipos de información (Figura 6; Suzuki, 1996; Suzuki y Naya, 2014).

1.2.1.4. Funciones

Tradicionalmente, las estructuras del LTM se han relacionado con funciones relacionadas con la memoria, siendo el hipocampo una estructura fundamental en los procesos de codificación y consolidación de la memoria episódica y declarativa (Dickerson y Eichenbaum, 2010; Scoville y Milner, 1957). Más específicamente, el hipocampo ha sido relacionado con la memoria declarativa, la memoria espacial y la memoria emocional (Strange *et al.*, 2014), pero también se le ha relacionado con otras funciones como la detección de “novedad”, la consolidación de la memoria dependiente de sueño, la discriminación de patrones, la navegación espacial y la unión de representaciones distribuidas espacial y temporalmente, interviniendo también en la regulación de las emociones, el miedo, la ansiedad y estrés (Bartsch y Wulff, 2015). Puesto que la CTE

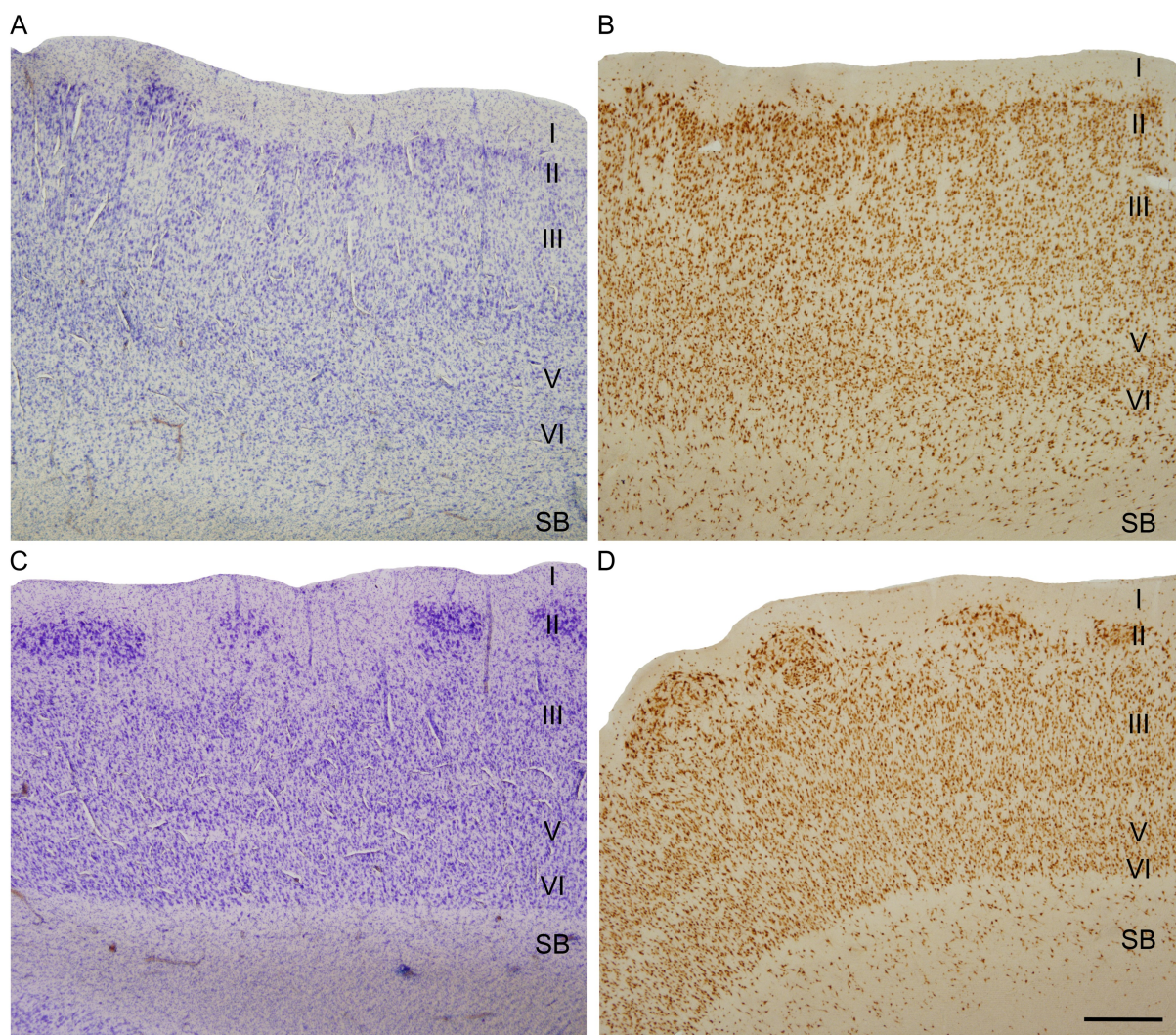


Figura 5. Secciones coroneales de la CTE y la CE humana de un sujeto control (AB2). En A y B se muestran las diferentes capas de la CTE humana en una tinción de Nissl (A) y en una tinción anti-NeuN (B). En C y D se muestran las diferentes capas de la CE humana en una tinción de Nissl (C) y en una tinción anti-NeuN (D). Barra de escala (en D): 1mm. SB: sustancia blanca

está fuertemente relacionada con la CE y ambas constituyen una puerta de entrada de información sensorial desde estructuras subcorticales y corticales a la formación del hipocampo, indirectamente la CTE estaría implicada en el mantenimiento de la memoria declarativa, así como de otras funciones sensoriales atribuidas a la formación del hipocampo (Ding y Van Hoesen, 2010). Dada la regionalización existente en el hipocampo y en las cortezas adyacentes, se ha postulado que existen diferentes propieda-

des funcionales a lo largo del eje longitudinal del hipocampo (Strange *et al.*, 2014). Así, se ha atribuido un papel más específico a las estructuras anteriores a la formación del hipocampo, las cuales formarían un circuito anterior del LTM que estaría implicado en la memoria declarativa libre de contexto (Didic *et al.*, 2011). Además, estudios de lesión de la CPR han atribuido a dicha región funciones específicas en el reconocimiento de nuevos objetos (Dickerson y Eichenbaum, 2010).

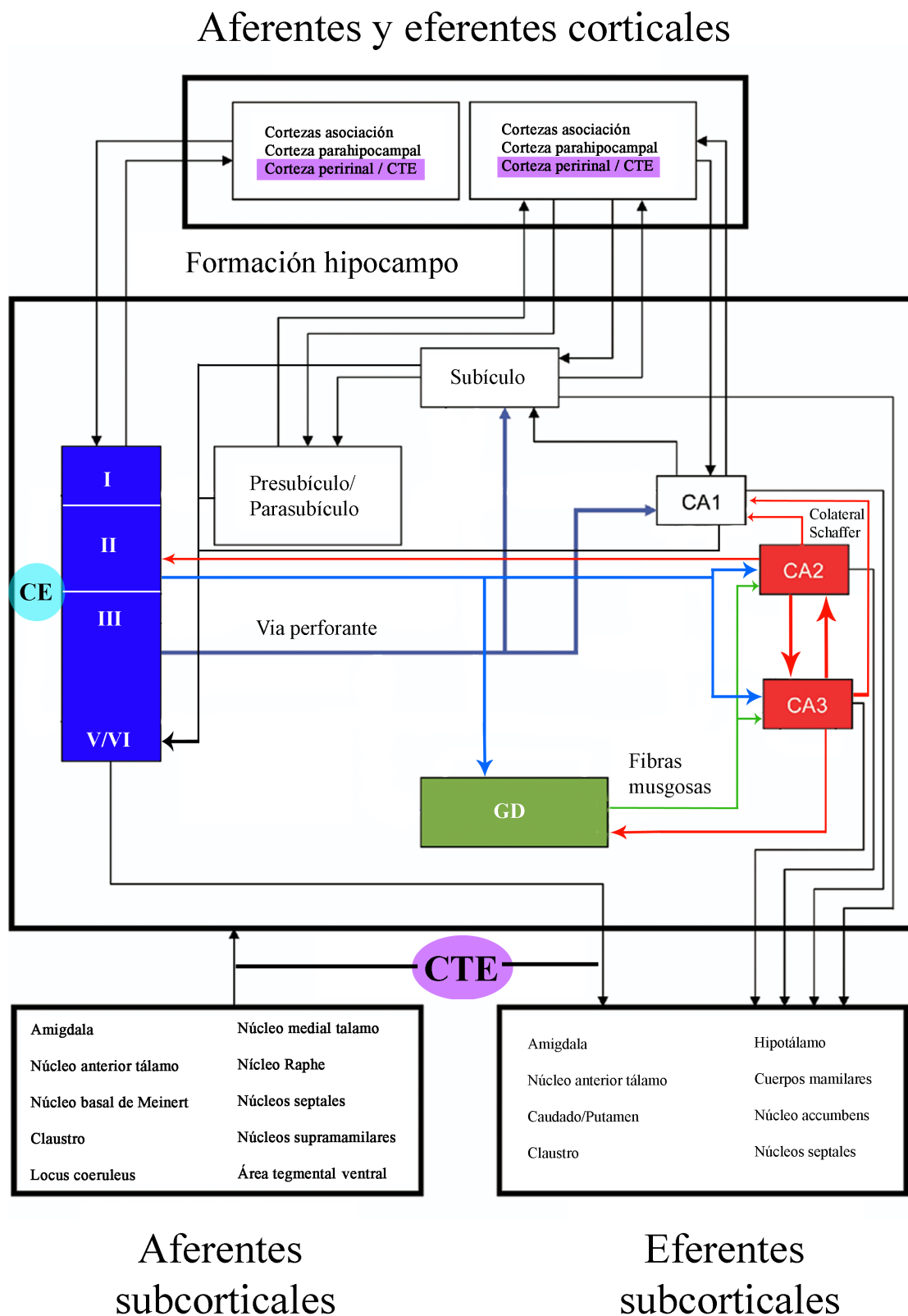


Figura 6. Esquema de las principales conexiones intrínsecas y extrínsecas de la formación del hipocampo.
Modificada de DeFelipe *et al.*, 2007.

Finalmente, dada la importancia de la información que recibe la CPR desde la amígdala y su paso hacia la CE, la CTE se ha propuesto como parte fundamental en la formación de memoria con componente emocional (Kajiwara *et al.*, 2003; Pikkarainen y Pitkänen, 2001; Suzuki, 1996).

1.2.2. Corteza Entorrinal

1.2.2.1. Localización

El término de CE fue acuñado por Brodmann en 1909 como sinónimo del área que había definido como área 28. Es un tipo de perialocorteza que ocupa gran parte del giro parahippocampal, siendo uno de los constituyentes del LTM (Figuras 1 y 2). A nivel medial, la CE está limitada por la corteza periamigdaloides en su parte más rostral y por el pre- y parasubiculo en su parte más caudal. A nivel lateral su delimitación en el cerebro humano no es sencilla, la CE se extiende a lo largo del surco colateral, donde está bordeada por la CPR y a nivel posterior las cortezas parahippocámpales (Insausti *et al.*, 1995, 1998, 2017; Insausti y Amaral, 2012; Van Hoesen, 1995).

1.2.2.2. Citoarquitectura

La CE es una estructura multilaminar que presenta un gradiente de diferenciación citoarquitectónica a lo largo del eje rostro-caudal que permite la diferenciación de varios campos a lo largo del mismo (Insausti *et al.*, 1995, 2017). La CE es un tipo de perialocorteza que se divide en seis capas cuya nomenclatura ha ido variando a lo largo de la historia (Braak y Braak, 1992). Braak y Braak diferencian en la CE una capa mole-

cular y un estrato principal externo e interno separados por una zona escasa de células (*lamina dissecans*). Insausti y Amaral utilizan una denominación numérica, de forma que la capa molecular se correspondería con la capa I; el estrato principal externo con las capas superficiales II-III; el estrato principal interno con las capas profundas V-VI, y la *lamina dissecans* con la capa IV (Figura 7).

Siguiendo la nomenclatura de Insausti y Amaral, la capa I se caracteriza por ser una capa plexiforme acelular rica en fibras mielínicas que aumenta su grosor en niveles posteriores. La capa II es característica de esta región y está formada por islas de células piramidales modificadas, que aparecen intensamente teñidas, y células estrelladas. Estas islas de células se mantienen a lo largo de toda la extensión rostro-caudal de la CE, aunque tienden a ser más estrechas en niveles rostrales. La capa III está formada por células piramidales pequeñas que tienen una apariencia columnar en niveles caudales y más en forma de parches en niveles mediales y rostrales. Las dendritas de las neuronas piramidales de la capa III tienden a organizarse en columnas entre los intersticios de las islas de células de la capa II. La capa IV o *lamina dissecans* es una característica banda acelular que en algunas ocasiones es tan fina que las capas III y V aparecen casi juntas, principalmente en niveles rostromediales y caudales. La capa V está formada por neuronas piramidales grandes densamente teñidas. Esta capa se encuentra más desarrollada a niveles caudales, donde se pueden diferenciar tres partes: una parte más superficial (Va) formada por células piramidales; una parte media (Vb) con células dispuestas más hol-

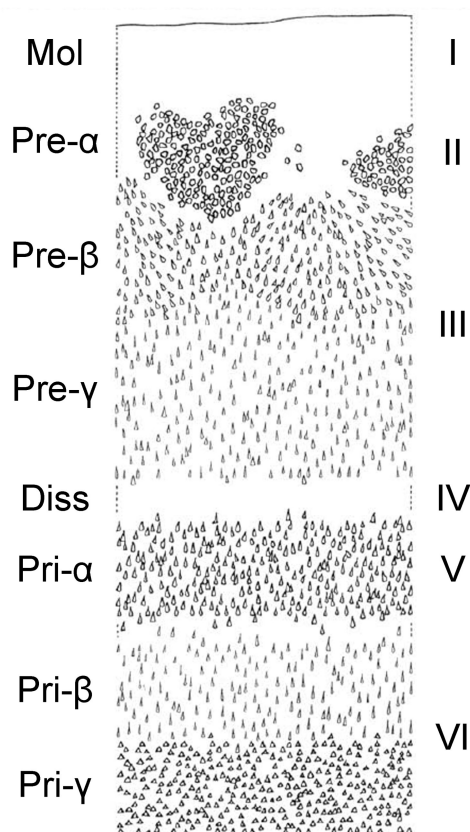


Figura 7. Esquema de cada una de las capas que forman la CE. A la izquierda, se representa la nomenclatura usada por Braak y Braak para denominar cada una de las capas de la CE. A la derecha se muestra la nomenclatura adoptada por Insausti y Amaral. Diss: *lamina dissecans*. Mol: capa molecular. Pre: Estrato principal externo. Pri: Estrato principal interno. Modificada de Braak y Braak, 1992.

gadamente; y una parte más profunda (Vc) que contiene menos neuronas y un plexo de fibras. La capa VI está formada por células piramidales más redondeadas y células nerviosas multipolares. En niveles rostrales la capa VI es más difícil de diferenciar de la capa V, y forma un gradiente decreciente de células según se va acercando a la sustancia blanca. En niveles más caudales, la capa VI presenta un borde más marcado con la sustancia blanca (Figura 5C-D; Braak y Braak, 1992; Insausti *et al.*, 1995; Insausti y Amaral, 2012).

1.2.2.3. Conectividad

Estudios realizados principalmente en roedor y en mono han mostrado que, al igual que la CTE, la CE recibe aferencias sensoriales de diferentes áreas de asociación, pero también establece conexiones recíprocas con otras estructuras subcorticales, posicionándose así como una puerta de flujo de información entre las regiones corticales y la formación del hipocampo. Así, las neuronas piramidales de las capas superficiales de la CE (capas II/III) reciben mayoritariamente aferencias desde otras regiones corticales, así como del pre y parasubículo. Las neuronas de estas capas superficiales proyectan hacia el GD y el hipocampo, constituyendo lo que se denomina la vía perforante. Concretamente, las neuronas de la capa II de la CE proyectan principalmente a la capa molecular del GD y a CA3; mientras que las neuronas de la capa III de la CE proyectan principalmente al subículo y a CA1. Esta proyección directa de la CE hacia el subículo y el hipocampo es fundamental para el correcto funcionamiento de la formación del hipocampo. Una vez que la información ha pasado por el hipocampo, retorna desde la formación del hipocampo a las neuronas de las capas profundas de la CE (V/VI). Dichas neuronas, proyectan hacia las propias capas superficiales de la CE, enviándose la información de vuelta a las áreas corticales de asociación. Además de establecer conexiones recíprocas con diferentes cortezas de asociación, la CE establece interconexiones con otras estructuras subcorticales como la amígdala, los núcleos septales o el tálamo, así como con regiones adyacentes como la CPR, las cortezas parahipocampales o la corteza insular

(Figura 6; Braak y Braak, 1992; DeFelipe *et al.*, 2007; Duvernoy, 2005; Insausti y Amaral, 2012; Van Hoesen *et al.*, 1991). De esta forma, tanto la CPR como la CE actúan como puertas de entradas de la información sensorial a la formación del hipocampo, filtrando además el retorno de la información sensorial procesada por el hipocampo hacia las diferentes áreas de asociación.

1.2.2.4. Funciones

Aunque tradicionalmente los primeros estudios relacionados con la codificación de la información espacial se realizaron en el hipocampo, estudios realizados principalmente en roedores y primates no humanos han demostrado la participación de la CE medial en el procesamiento de la información relacionada con la navegación y la memoria espacial (Dickerson y Eichenbaum, 2010). Así, se ha descrito la existencia en la CE medial de las células de red (en inglés, *grid cells*), localizadas principalmente en las capas superficiales de la CE medial y que estarían relacionadas con la codificación de un mapa espacial del entorno, es decir, con la posición (Fuchs *et al.*, 2016; Strange *et al.*, 2014). Junto con las células de red, se han descrito en la CE medial unas células especializadas en codificar la dirección de la cabeza, que actuarían como una brújula (en inglés, *head direction cells*); células especializadas en codificar la proximidad a los límites o barreras del entorno (en inglés, *border cells*); y células especializadas en codificar otras características del entorno como colores o formas (en inglés *nongrid cells*; Burgalossi y Brecht, 2014; Diehl *et al.*, 2017). Estos tipos celulares descritos en la CE medial formarían junto con las células de lugar (en

inglés, *place cells*) del hipocampo un circuito fundamental para el procesamiento, codificación y representación de la información espacial (Moser *et al.*, 2017; Stensola y Moser, 2016). De nuevo, al igual que la CTE, la CE constituye una puerta de entrada de información sensorial hacia la formación del hipocampo, por lo que no solamente es fundamental para el mantenimiento del procesamiento de la información espacial, sino que estaría implicada en el mantenimiento del resto de funciones atribuidas a la formación del hipocampo.

2. ORGANIZACIÓN SINÁPTICA DE LA CORTEZA CEREBRAL

2.1. Sinapsis corticales

En 1897, Charles Sherrington introdujo el término “sinapsis” para denominar el contacto —hipotéticamente unidireccional— entre los axones y las dendritas o los cuerpos celulares (Foster y Sherrington, 1897). En función del mecanismo de transmisión de la información, las sinapsis se pueden dividir en sinapsis eléctricas o sinapsis químicas.

2.1.1. Sinapsis eléctricas

Las sinapsis eléctricas se caracterizan porque el paso de la información entre dos células se realiza mediante canales intercelulares que se denominan uniones estrechas (en inglés, *gap junctions*). Las uniones estrechas están formadas por el anclaje de dos proteínas hexaméricas llamadas conexinas, cada una en una de las células adyacentes, produciéndose así una comunicación directa y bidireccional entre ambas células me-

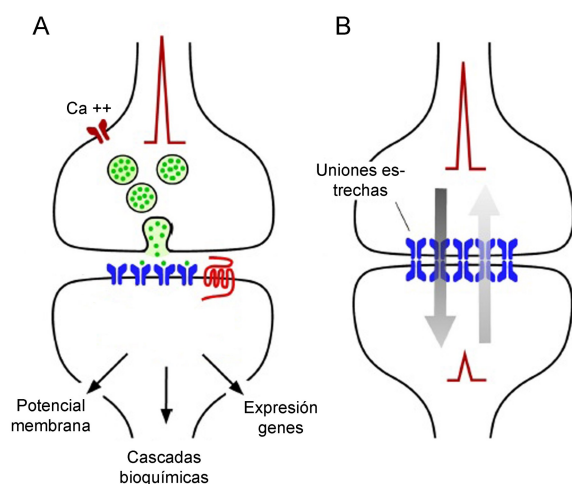


Figura 8. Esquema de los dos principales tipos de transmisión de la información en el sistema nervioso. A: esquema de una sinapsis química. Se puede diferenciar un elemento presináptico, uno postsináptico y una hendidura sináptica. En estas sinapsis la maquinaria de transmisión de la información es sofisticada y permite un flujo de información unidireccional con la amplificación de la información en el elemento postsináptico. **B:** esquema de una sinapsis eléctrica. Se pueden observar dos células adyacentes unidas por canales de conexinas que conforman uniones estrechas y que permiten un flujo de información bidireccional mediante el intercambio de iones y pequeñas moléculas. Modificada de Pereda, 2014.

diente el paso de corrientes eléctricas y pequeñas moléculas (Figura 8; Pereda, 2014). Dadas las dificultades en el estudio de las sinapsis eléctricas, siempre se ha descrito que dichas sinapsis eran mucho más abundantes en los invertebrados, pero hoy en día se sabe que las sinapsis eléctricas también se encuentran ampliamente distribuidas en el cerebro de los mamíferos, siendo frecuentes en las interneuronas inhibitorias (Nagy *et al.*, 2018). A pesar de que las sinapsis químicas parecen ser estructuralmente más complejas que las sinapsis eléctricas, y funcionalmente son más dinámicas,

y plásticas, las sinapsis eléctricas son también estructuras dinámicas y funcionalmente complejas. Las sinapsis eléctricas no tienen por qué ser imágenes especulares a ambos lados, sino que pueden presentar asimetrías moleculares en cada una de las células conectadas, siendo así funcionalmente diversas (Miller y Pereda, 2017). Finalmente, se ha demostrado que ambos tipos de sinapsis pueden coexistir y cooperar, siendo esta interacción fundamental durante el desarrollo para la formación de los circuitos neuronales y durante la etapa adulta para su reconfiguración. Este tipo de sinapsis mixtas se han descrito principalmente en invertebrados, pero cada vez hay más literatura que las sitúa también en el sistema nervioso de los mamíferos (Pereda, 2014).

2.1.2. Sinapsis químicas

Las sinapsis químicas se caracterizan porque el paso de la información se produce mediante la liberación por parte del elemento presináptico de una molécula química denominada neurotransmisor, que interacciona con receptores específicos localizados en la membrana del elemento postsináptico. En este caso, el flujo de información es unidireccional. Desde un punto de vista morfológico, las sinapsis químicas están constituidas por un elemento presináptico (terminal axónico) que contiene las vesículas de neurotransmisor; un elemento postsináptico, que puede ser un soma neuronal, un tallo dendrítico o una espina dendrítica; y una hendidura sináptica entre ambos elementos (Gray, 1959a; Peters *et al.*, 1991; Peters y Palay, 1996).

2.1.2.1. Tipos de sinapsis químicas

Los primeros estudios de microscopía electrónica realizados en la corteza cerebral de rata revelaron la existencia de dos tipos morfológicos de sinapsis dependiendo del grosor de la densidad postsináptica: las sinapsis de tipo I y las sinapsis de tipo II (Gray, 1959a). Las sinapsis de tipo I también se denominan sinapsis asimétricas (Colonnier, 1968) y se caracterizan por presentar una banda prominente de material electrodensito de unos 40nm de grosor en la cara citoplasmática de la membrana postsináptica. Las sinapsis de tipo II también se denominan sinapsis simétricas (Colonnier, 1968), y se caracterizan por tener una densidad postsináptica más delgada de aproximadamente 10nm, presentando las membranas pre y postsináptica un grosor similar (Figura 9; Gray, 1959a; Peters y Palay, 1996). Estas diferencias en las características morfológicas entre ambos tipos de sinapsis permiten su diferenciación en los estudios de microscopía electrónica.

Funcionalmente, las sinapsis asimétricas son excitadoras y usan principalmente glutamato como neurotransmisor, mientras que las sinapsis simétricas son inhibitoras y usan GABA mayoritariamente como neurotransmisor (DeFelipe y Fariñas, 1992; Houser *et al.*, 1984; Peters y Palay, 1996). Aunque el glutamato y el GABA son los neurotransmisores más comunes, existen más tipos de neurotransmisores que son utilizados por diferentes neuronas en el sistema nervioso (DeFelipe, 1993). Estudios cuantitativos realizados en la neocorteza han demostrado que la mayoría de las sinapsis son asimétricas o excitadoras (90%) mientras que el resto (10%) son sinapsis simétricas o

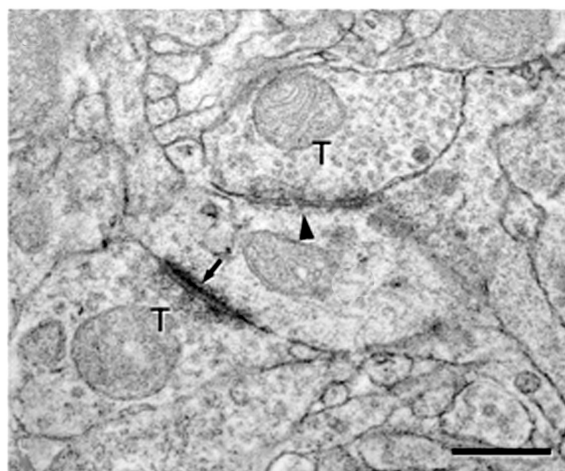


Figura 9. Fotografía de microscopía electrónica de dos sinapsis de la capa III del neocórtex temporal humano. La flecha indica una sinapsis asimétrica o excitadora. La punta de flecha indica una sinapsis simétrica o inhibitora. T: terminal axónico. Escala: 400 nm. Modificada de Alonso-Nanclares *et al.*, 2008.

inhibidoras (DeFelipe *et al.*, 2002). Este balance entre sinapsis excitadoras e inhibitoras se mantiene más o menos constante entre diferentes regiones corticales y especies (DeFelipe *et al.*, 2002).

2.1.2.2. Forma y tamaño de las sinapsis

El tamaño y la forma de las sinapsis son dos parámetros fundamentales directamente relacionados con la funcionalidad de las sinapsis. Se ha descrito que el tamaño de la zona activa del elemento presináptico es directamente proporcional al número de vesículas ancladas y, por tanto, a la probabilidad de liberación de vesículas de neurotransmisor (Matz *et al.*, 2010), mientras que el tamaño de la densidad postsináptica es directamente proporcional al número de receptores anclados a la membrana postsináptica (Nusser *et al.*, 1998). Por tanto, cambios en el tamaño de la zona activa y la

densidad postsináptica (PSD, por sus siglas en inglés *Post Synaptic Density*) están relacionados con cambios en la funcionalidad de las sinapsis.

Las sinapsis son elementos dinámicos que pueden sufrir modificaciones no solamente debido a cambios en sus patrones de actividad, sino también cambios morfológicos y moleculares (Wegner *et al.*, 2018). Así, las sinapsis se encuentran continuamente en proceso de remodelación, eliminándose, formándose o cambiando de forma (Fauth y Tetzlaff, 2016; Peters *et al.* 1991).

Simplificando, morfológicamente, las sinapsis pueden presentar cuatro formas diferentes: macular (cuando la PSD es continua en forma de disco); perforada (cuando la PSD presenta uno o más agujeros); herradura (cuando la PSD tiene un perímetro con una hendidura en forma de herradura); y fragmentada (cuando la PSD se encuentra dividida en dos o más fragmentos independientes; Figura 10). Aunque no se conocen las consecuencias funcionales de las diferentes morfologías sinápticas, se han relacionado las morfologías no maculares con sinapsis más complejas de mayor eficacia en la transmisión de la información, ya que los procesos de remodelación sináptica hacia morfología más complejas conllevan la formación de perímetros más tortuosos y la incorporación de nuevos receptores en la PSD (Lüscher *et al.*, 2000).

2.1.2.3. Localización de las sinapsis

En la corteza cerebral, la mayoría de los contactos sinápticos se establece en las espinas dendríticas (Gray, 1959b), de forma que entre un 90-98% de las sinapsis se encuentran en el neuropilo (Alonso-Nanclares

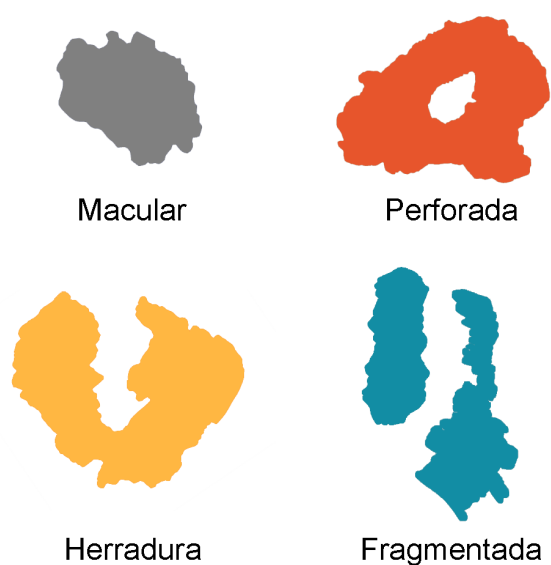


Figura 10. Representación esquemática de la morfología de las uniones sinápticas. Sinapsis maculares con una PSD continua en forma de disco; sinapsis perforadas con uno o más agujeros en la PSD; sinapsis en herradura con hendiduras en el perímetro y sinapsis fragmentadas con dos o varias PSDs sin conexión entre ellas.

et al., 2008; Peters *et al.*, 1991). Esto es debido a que una célula piramidal contiene del orden de miles de espinas dendríticas, cada una de las cuales recibe al menos una sinapsis, mientras que el resto del árbol dendrítico y el soma neuronal constituyen una parte minoritaria de la superficie neuronal total (DeFelipe y Fariñas, 1992). Así, la mayoría de las sinapsis que recibe una neurona piramidal son sinapsis axoespinosas, mientras que las sinapsis axosomáticas y las axodendríticas son bastante menos numerosas. También se han descrito sinapsis en los segmentos iniciales axonales de células piramidales (sinapsis axoaxonales; DeFelipe y Fariñas, 1992).

En el neuropilo, la mayoría de las sinapsis (80-95%) son excitadoras y provienen de neuronas corticales con espinas (neuronas piramidales y estrelladas) y fibras extrínse-

cas, mientras que el resto de las sinapsis (5-20%) son inhibitorias y provienen de interneuronas locales (DeFelipe, 2011; DeFelipe y Fariñas, 1992). Generalmente, las sinapsis excitadoras se localizan más distalmente en los árboles dendríticos; mientras que las sinapsis inhibitorias se localizan principalmente en los somas neuronales y en las dendritas proximales, siendo su localización relevante en términos de funcionalidad (Peters y Palay, 1996). Las sinapsis descritas en los segmentos iniciales axonales son exclusivamente de tipo inhibitorio (DeFelipe y Fariñas, 1992).

2.2. Elementos postsinápticos

Tal y como se ha comentado previamente (ver apartado 2.1.2), en las sinapsis químicas se puede diferenciar un elemento postsináptico, que puede ser: un soma neuronal, un tallo dendrítico, una espina dendrítica o un terminal axónico. Teniendo en cuenta que en la corteza cerebral la mayoría de los contactos sinápticos se establece en las espinas dendríticas (Gray, 1959b), las sinapsis axoespinosas (sinapsis localizadas en las espinas dendríticas) son las más frecuentes.

2.2.1. Principales elementos postsinápticos: espinas dendríticas

2.2.1.1. Aspectos generales

Las espinas dendríticas son pequeñas protuberancias presentes en las dendritas de las células piramidales y células estrelladas de la capa IV, y constituyen el sitio donde se producen la mayoría de los contactos sinápticos en la corteza cerebral. Su existencia fue demostrada por Santiago Ramón y Cajal

en 1888 en el estudio *Estructura de los centros nerviosos de las aves*, donde gracias a la aplicación del método de Golgi, Cajal describió la presencia de estas estructuras en las dendritas de las células de Purkinje. Dos años más tarde, Cajal describió la existencia de espinas dendríticas también en la corteza cerebral (1890), sin embargo, la existencia y función de las espinas dendríticas generó una gran controversia en la literatura a lo largo de los años (DeFelipe, 2015). Puesto que para Cajal las espinas dendríticas eran elementos clave en la estructura y función de las neuronas, utilizó otros métodos de tinción, principalmente el método del azul de metileno, para demostrar que las espinas no eran artefactos, sino disposiciones anatómicas reales (Figura 11). No fue hasta 1959 cuando Gray (Gray, 1959b) mostró por primera vez en un estudio de microscopía electrónica las espinas dendríticas como elementos postsinápticos, considerándose como la principal diana de las aferencias excitadoras (Colonnier, 1968). Actualmente, está ampliamente aceptado que las espinas dendríticas son el sitio donde se producen la mayoría de los contactos sinápticos excitadores en la corteza cerebral, siendo además elementos clave en el aprendizaje, memoria y cognición (Yuste, 2010). Sin embargo, aunque se apoya la asunción de “una espina corresponde a una sinapsis excitadora”, se ha descrito que existen espinas dendríticas que establecen más de una sinapsis, y que en torno a un 4% de las espinas dendríticas no presentan contactos sinápticos, pudiendo representar estructuras que estén bien en formación, o bien desapareciendo (Arellano *et al.*, 2007b).

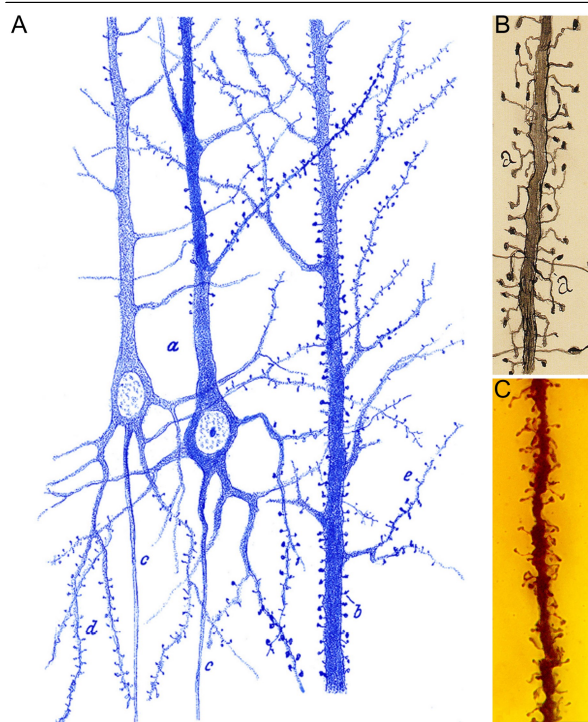


Figura 11. Dibujos realizados por Santiago Ramón y Cajal mostrando la existencia de las espinas dendríticas. **A:** dibujo realizado por Santiago Ramón y Cajal de las espinas dendríticas de una neurona piramidal teñida por el método de azul de metileno. **B:** dibujo realizado por Santiago Ramón y Cajal de las espinas dendríticas de una neurona piramidal de la corteza cerebral de un niño de dos meses. **C:** fotografía de una preparación de Santiago Ramón y Cajal de la corteza motora humana de un niño de nueve meses teñida con el método de Golgi. Barra de escala (en C): 8µm. Modificada de DeFelipe, 2015.

2.2.1.2. Morfología y funcionalidad de las espinas dendríticas

Aunque las espinas pueden presentar una gran variedad de formas, todas ellas están formadas esencialmente por una cabeza y un cuello anclado al tallo de la dendrita de la neurona. Tradicionalmente, las espinas dendríticas han sido clasificadas en función de su morfología en dos grupos principales: espinas dendríticas sésiles y espinas dendríticas pedunculadas (Jones y Powell, 1969). Las espinas dendríticas sésiles se caracteri-

zan por no presentar, o apenas presentar, una constricción o cuello que las une a la dendrita; mientras que las espinas dendríticas pedunculadas se caracterizan porque presentan un pedúnculo estrecho de longitud variable que las une por un lado a la dendrita y por otro se engrosa formando un bulbo en forma de copa. Adicionalmente, Peters y Kaiserman-Abramof describieron en 1970 tres tipos de espinas dendríticas: espinas dendríticas sésiles, espinas dendríticas finas y espinas dendríticas fungiformes, pudiéndose incluir los dos últimos tipos como espinas dendríticas pedunculadas. En este caso, las espinas dendríticas finas se diferencian de las fungiformes en que las primeras tienen un cuello delgado y largo y una cabeza pequeña, mientras que las espinas dendríticas fungiformes presentan un cuello más ancho y una cabeza grande e irregular (Peters y Kaiserman-Abramof, 1970). Además, se han descrito espinas ramificadas con múltiples ramificaciones que salen de un mismo origen, y filopodios, que son apéndices que salen del cuerpo dendrítico. Sin embargo, aunque esta clasificación haya sido ampliamente utilizada en la literatura, muchos estudios han descrito una multitud de morfologías con características intermedias, siendo muy complicado clasificar las espinas de acuerdo a su morfología utilizando la clasificación tradicional (Arellano *et al.*, 2007b). Por otro lado, las espinas dendríticas son estructuras que presentan motilidad, sobre todo durante el desarrollo, pero también en diferentes condiciones fisiológicas en el adulto, pudiendo cambiar su morfología a lo largo del tiempo. Estas variaciones en la morfología de las espinas dendríticas están relacionadas con su funcionalidad, ya que se ha relacionado

el tamaño de la cabeza de la espina dendrítica con el tamaño de la PSD y con el terminal presináptico, relacionándose, por tanto, con el número de receptores postsinápticos y la probabilidad de liberación de neurotransmisor. Además, la longitud del cuello de la espina dendrítica se ha relacionado con el grado de aislamiento eléctrico y bioquímico de la misma. De esta forma, las espinas dendríticas actúan como compartimentos locales donde se concentran las moléculas necesarias para la señalización celular, estando relacionadas con la regulación a nivel local de la eficacia sináptica (Arellano *et al.*, 2007b; Benavides-Piccione *et al.*, 2003). Sobre este respecto, numerosos estudios han propuesto que la actividad neuronal puede inducir cambios en las espinas dendríticas. Estos cambios se han relacionado con mecanismos de plasticidad sináptica, como la potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés *Long-Term Potentiation*), y se han propuesto como el sustrato estructural del aprendizaje y la memoria. Así, se ha descrito la formación de nuevas espinas dendríticas después de la inducción de LTP, pero también el aumento del volumen de la cabeza de la espina dendrítica tras una estimulación eléctrica debido a la incorporación de nuevos receptores de glutamato en la PSD (Segal, 2017; Yuste, 2010).

2.2.1.3. Composición de las espinas dendríticas

En términos generales, en el interior de la cabeza de la espina dendrítica se localiza la PSD, la cual a su vez está formada mayoritariamente por receptores postsinápticos, pero también por proteínas de anclaje y del

citoesqueleto así como moléculas de señalización celular. El citoplasma de las espinas dendríticas contiene filamentos de actina que conforman el citoesqueleto, así como algunos orgánulos. Se han descrito en la mayoría de las espinas dendríticas polirribosomas, que han sido asociados a la síntesis local de proteínas sinápticas, y retículo endoplásmico liso. En las espinas más grandes, normalmente el retículo endoplásmico liso se puede encontrar formando lo que se denomina aparato de espina, el cual estaría constituido por la asociación de varias cisternas de retículo endoplásmico liso separadas por placas de material electrodensito. Esta estructura se ha relacionado con la regulación de los niveles de calcio dentro de la espina, así como de otras moléculas de señalización. Orgánulos como las mitocondrias raramente se encuentran dentro de las espinas dendríticas, siendo mucho más frecuentes en los tallos dendríticos (Oliver von Bohlen und Halbach, 2009; Santuy *et al.*, 2018b).

2.3. Estudio tridimensional de la organización sináptica cortical

El estudio de la distribución, proporción y características morfológicas de la sinapsis, así como su cuantificación en las diferentes regiones corticales es fundamental para el conocimiento de la organización de los circuitos corticales, siendo importante en términos de funcionalidad. Tradicionalmente, la cuantificación de las sinapsis se ha llevado a cabo de forma indirecta mediante la utilización de aproximaciones de microscopía óptica evaluando la inmunoreactividad de diferentes marcadores de proteínas sinápticas (Honer *et al.*, 1992; Masliah *et al.*,

1990). Asimismo, los estudios de microscopía electrónica sobre la estimación de la densidad sináptica y el estudio del tamaño sináptico han sido realizados en series de imágenes en dos dimensiones, siendo una técnica tediosa de elevado coste temporal. Aunque la utilización de imágenes seriadas proporciona resultados más fiables sobre la densidad y el tamaño de las sinapsis, dichos resultados pueden no ser del todo adecuados. En este sentido, la microscopía electrónica tridimensional (3D; FIB/SEM) ha resultado ser una herramienta excelente en el estudio de la organización sináptica cerebral (Blazquez-Llorca *et al.*, 2013). Este tipo de técnica permite la obtención de manera automática y en poco tiempo de series de imágenes que conforman un volumen 3D de la muestra a analizar. De esta forma, se pueden identificar de forma mucha más precisa los dos tipos morfológicos de sinapsis químicas, así como su número y distribución espacial 3D. Además, su visualización en 3D permite la distinción de los diferentes tipos morfológicos de sinapsis y los elementos postsinápticos donde están establecidas. Finalmente, el desarrollo de herramientas como la superficie sináptica de aposición (SAS, en inglés, *Synaptic Apposition Surface*) permite reproducir en 3D la forma y curvatura de las sinapsis, obteniéndose además información cuantitativa del tamaño de las mismas (Blazquez-Llorca *et al.*, 2013; Merchán-Pérez *et al.*, 2009).

3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

3.1. Definición y aspectos generales

La EA es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, considerada la causa más

común de demencia (representa en torno a un 60-80% de los casos). La manifestación clínica de la mayoría de los enfermos de EA comienzan después de los 65 años (casos de inicio tardío), y solamente un 5% de los casos de EA comienzan antes de los 65 años (son los denominados casos de inicio temprano; Alzheimer's Association, 2019). Esta enfermedad se caracteriza por un deterioro progresivo y persistente de las funciones cognitivas, como la orientación y la memoria, que conduce a una falta completa de autonomía y vida social de los pacientes en los estadios finales (Prieto *et al.*, 2011).

Aunque la demencia senil se conocía ya desde la antigua Grecia, no fue hasta 1906 cuando el patólogo y psiquiatra alemán Alois Alzheimer definió lo que sentaría las bases biológicas para describir el trastorno que se denominaría enfermedad de Alzheimer en su honor. En 1901 una mujer de 51 años (llamada Auguste Deter) fue ingresada en el Asilo Municipal para Enfermos Mentales y Epilépticos de Frankfurt. La paciente presentaba paranoia y dificultad para recordar eventos de su día a día. Enseguida la mujer empezó a desorientarse temporal y especialmente, y a presentar problemas cognitivos, de escritura y lenguaje. Alois Alzheimer, que trabajaba de médico en dicho asilo, se hizo cargo de ella. Cuando la mujer murió, Alzheimer analizó su cerebro y encontró unas alteraciones histopatológicas singulares: ovillos neurofibrilares, y lo que definió como "pequeños focos de depósitos de un material peculiar en la corteza cerebral", posteriormente denominados placas seniles (Figura 12; Engelhardt y Gomes, 2015; Ryan *et al.*, 2015). Ambas alteraciones constituirían los principales hitos histopatológicos de la EA.

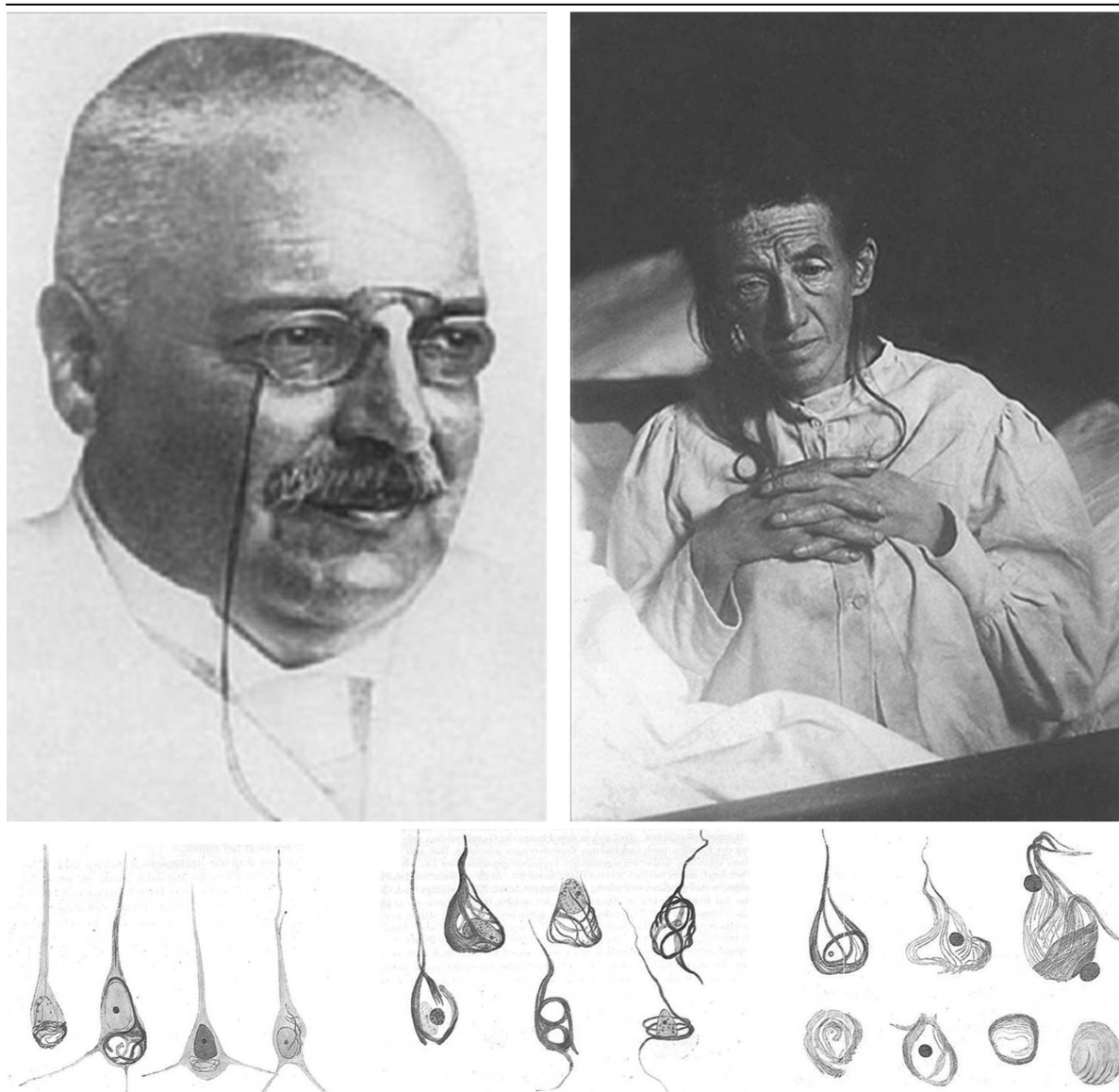


Figura 12. Imágenes de Alois Alzheimer y de la paciente Auguste D. Abajo se muestran dibujos realizados por Alois Alzheimer sobre las preparaciones histológicas de tejido cerebral de Auguste. Los dibujos representan alteraciones histopatológicas encontradas en el material analizado. Modificada de Engelhardt y Gomes, 2015.

3.2. Sintomatología y deterioro cognitivo

Los pacientes sintomáticos de EA suelen presentar un curso de síntomas característico y progresivo. Normalmente, los pacientes comienzan con problemas relacionados con el aprendizaje y la memoria, experimentando principalmente una pérdida gra-

dual en la adquisición de nuevas memorias. Esto va seguido de problemas en la atención y en la ejecución de tareas de su rutina diaria y, según progresa la enfermedad, empiezan a presentar problemas de orientación, con el lenguaje y la escritura. En los últimos estadios de la enfermedad, los pacientes presentan problemas sociales y de comportamiento, como por ejemplo

depresión y apatía (Alzheimer's Association, 2019). Aunque estos síntomas son comunes en un paciente con EA, pueden darse casos sintomáticos de variantes de la EA en los que los pacientes comienzan con problemas que no se relacionan con déficits de memoria, como por ejemplo desorientación espacial (Long y Holtzman, 2019). A pesar de que la EA parece tener un origen subcortical (núcleo basal de Meynert), los primeros síntomas de pérdida de memoria episódica están relacionados con la degeneración de estructuras del LTM (Braak y Del Tredici, 2012, 2015; Serrano-Pozo *et al.*, 2011) que incluyen la formación del hipocampo, la amígdala y las áreas corticales adyacentes (más abajo: *Alteraciones histopatológicas*).

Los síntomas clínicos de demencia se pueden evaluar mediante la utilización de herramientas estandarizadas, que son diferentes pruebas que gradúan la severidad de la demencia en función de la puntuación obtenida en los diferentes dominios cognitivos evaluados. Así, se evalúan típicamente cinco dominios cognitivos: orientación, atención, memoria, lenguaje y percepción. Cuando un paciente presenta declive cognitivo en al menos dos de los cinco dominios evaluados y, uno de ellos es la memoria, entonces se diagnosticará de EA. Si el paciente tiene problemas cognitivos, pero no encaja en el diagnóstico de demencia entonces será diagnosticado de deterioro cognitivo leve (Wilson *et al.*, 2012).

La EA se puede dividir en una primera fase presintomática en la que los pacientes no presentan problemas cognitivos; una fase sintomática prodrómica, en la que los pacientes presentan deterioro cognitivo leve; y una tercera fase sintomática de declive

cognitivo en la que los pacientes ya presentan problemas cognitivos severos que interfieren con sus rutinas diarias (Raskin *et al.*, 2015). Aunque el declive cognitivo se considera la primera manifestación clínica de la EA, éste puede presentarse varios años antes y acelerarse durante el transcurso de la enfermedad (aproximadamente un 80% de los casos de deterioro cognitivo acaba desarrollando EA), produciéndose primero un periodo de estabilidad cognitiva que finaliza en un declive cognitivo (Wilson *et al.*, 2012).

3.3. Alteraciones histopatológicas

Las dos principales características histopatológicas de la EA son los **ovillos neurofibrilares** de proteína tau hiperfosforilada (NTFs, por sus siglas en inglés *Neurofibrillary Tangles*) y las **placas seniles**, compuestas por la acumulación de péptido β -amiloide ($A\beta$). Junto con estas características histopatológicas principales se han descrito otras alteraciones como son neuritas distróficas, astrogliosis y activación de la microglía. La presencia de dichas alteraciones histopatológicas se relaciona con los procesos neurodegenerativos de pérdida sináptica y neuronal, produciéndose así una atrofia cortical macroscópica característica de la EA. Frecuentemente, se produce la coexistencia de dichas alteraciones con otras patologías, como patologías vasculares o de cuerpos de Lewy, o angiopatía amiloide cerebral (Long y Holtzman, 2019). También, se ha descrito una alteración de la proteína de unión al ADN TDP-43, así como la presencia de otros agregados proteicos como α -sinucleína (Robinson *et al.*, 2018).

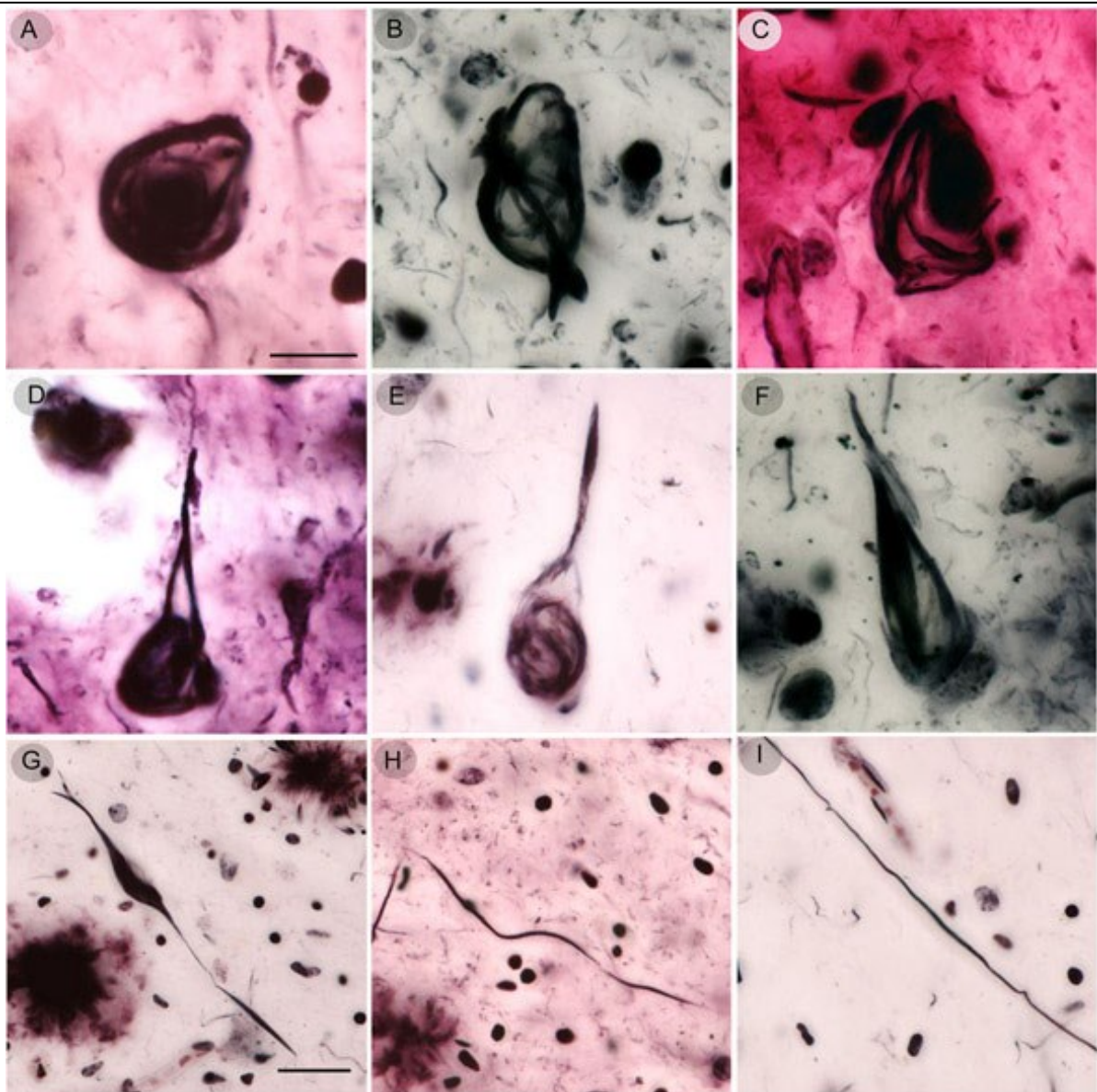


Figura 13. Preparaciones histológicas de Santiago Ramón y Cajal (Legado Cajal, Instituto Cajal) donde se muestran ovillos neurofibrilares (A-F) e “hilos” en el neuropilo (G-I) en la neocorteza y en el hipocampo. Las secciones están teñidas con el método de nitrato de plata amoniacal (A, C-E, G-I) y con el método de Bielschowsky (B, F). Tomada de García-Marín *et al.*, 2007.

3.3.1. Ovillos neurofibrilares

Los NTFs están compuestos por pares de filamentos helicoidales intracelulares de proteína tau hiperfosforilada. La proteína tau es una proteína de unión a microtúbulos cuya hiperfosforilación conduce a una pérdida de afinidad por los mismos. Esto conlleva a que se produzca un aumento de

la concentración de la proteína tau en el citosol, lo que favorece su transporte del compartimento axonal al compartimento somatodendrítico y su agregación. Cuando la proteína tau se hiperfosforila y agrega formando los NTFs, éstos se acumulan intracelularmente, lo que acaba produciendo en último término la muerte neuronal, observándose en este caso lo que se denomi-

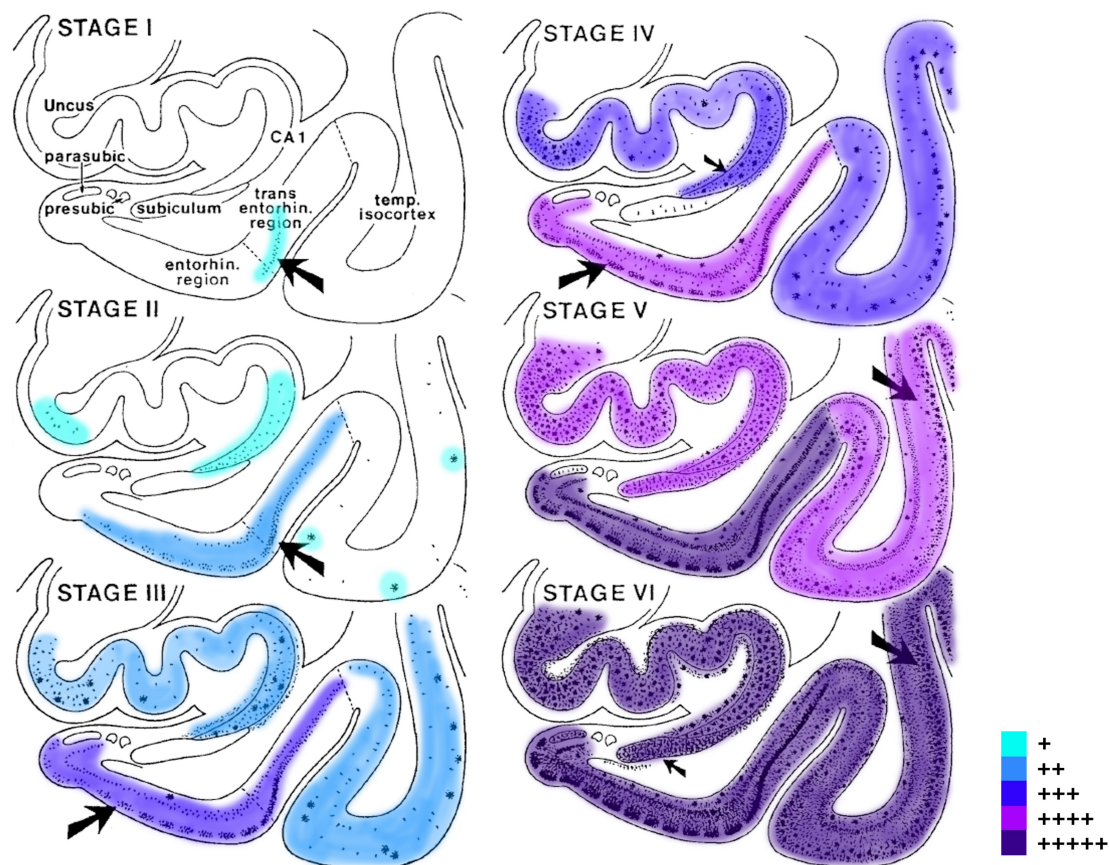


Figura 14. Esquema de la patología neurofibrilar observada en la formación del hipocampo y en la neocorteza temporal adyacente. Nótese la evolución de los cambios desde el estadio I hasta estadio VI. Modificada de Braak y Braak (1991).

na "ghost tangle" (Braak y Braak, 1991). Junto con los NTFs se ha descrito también la presencia de "hilos" en el neuropilo formados por restos de axones y dendritas con material fibrilar (Figura 13; Braak *et al.*, 1994; Long y Holtzman, 2019; Raskin *et al.*, 2015).

Los NTFs se desarrollan principalmente en neuronas corticales y neuronas de proyección de núcleos subtalámicos de axones largos mielinizados, mientras que son mucho menos frecuentes en interneuronas y neuronas de axón corto poco mielinizado (Braak y Del Tredici, 2015). Los NTFs presentan un patrón de propagación estereotipado a través de circuitos conectados anatómicamente. De esta forma, se distinguen

seis estados de la progresión de la patología: estados transentorrinales o I-II; estados límbicos o III-IV; estados isocorticales V-VI (Figuras 14 y 15; Braak y Braak, 1991).

Aunque el patrón de distribución de los NTFs está muy bien establecido, en estudios de resonancia magnética de emisión de positrones realizados en pacientes sin problemas cognitivos y positivos para patología amiloide, se ha identificado acumulación de proteína tau fuera de la corteza entorrinal, lo que sugiere que su propagación no está espacialmente tan restringida como se pensaba (Long y Holtzman, 2019). Igualmente, parece ser que el patrón de distribución de los ovillos neurofibrilares se relaciona con la sintomatología presen-

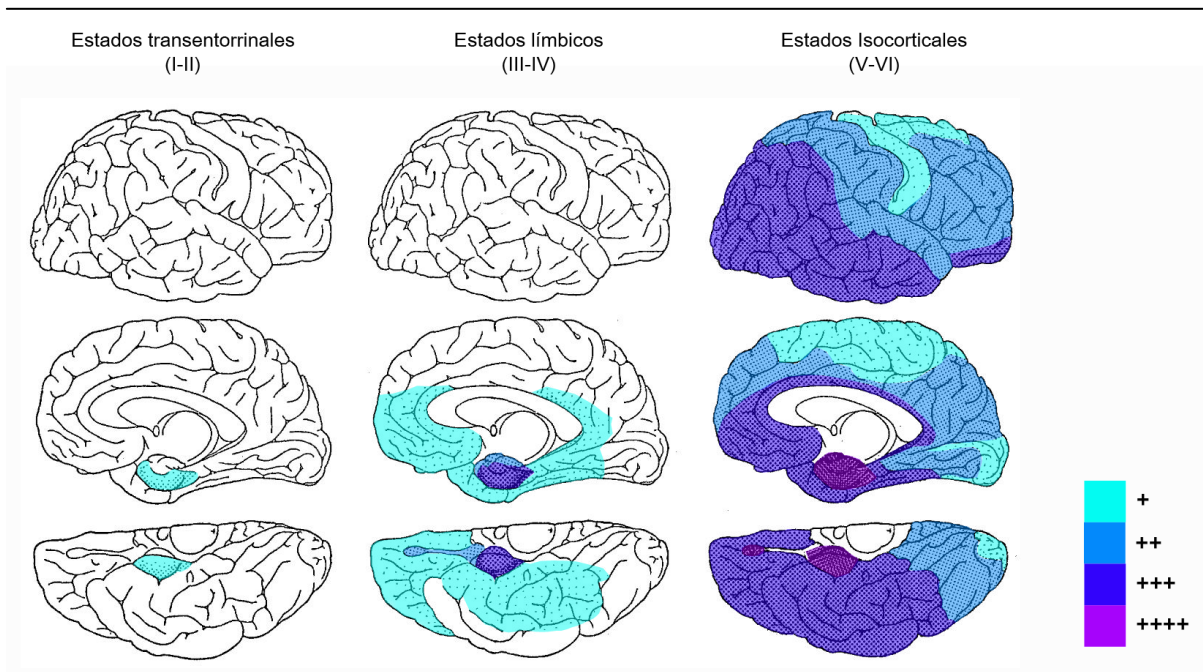


Figura 15. Esquema del patrón de distribución de los ovillos neurofibrilares propuesto por Braak y Braak (1991). Nótese que la patología se inicia en zonas mesiales y que en los estadios finales todas las áreas de la neocorteza están en mayor o menor medida afectadas. Las neuronas de la corteza transentorrinal son las primeras en presentar ovillos neurofibrilares (estados transentorrinales). Las áreas más resistentes a la patología neurofibrilar son las motoras y visuales. Modificada de Braak y Braak (1991).

tada por los pacientes con EA, de forma que los primeros síntomas de pérdida de memoria episódica se relacionan con las alteraciones de las estructuras del LTM, apareciendo ya el resto de síntomas relacionados con los demás dominios cognitivos con la progresión de la atrofia hacia otras regiones isocorticales de asociación (Long y Holtzman, 2019).

3.3.2. Placas seniles

Las placas seniles están constituidas por la acumulación extracelular del péptido A β , el cual se produce tras el procesamiento de la proteína precursora amiloide. Cuando se produce un desequilibrio entre la producción y eliminación del péptido A β entonces se produce su acumulación extracelular, generándose así las placas seniles (Serrano-

Pozo *et al.*, 2011; Thal *et al.*, 2006). Morfológicamente, se pueden diferenciar principalmente dos tipos de placas: las placas seniles difusas, que presentan un contorno irregular y un núcleo que no está claramente definido; y las placas seniles de núcleo denso, que están formadas por una masa central de filamentos extracelulares que se extiende radialmente hacia la periferia (Figura 16). Las placas difusas se encuentran principalmente en la corteza cerebral, ganglios basales, tálamo e hipotálamo; mientras que las placas seniles de núcleo denso se distribuyen en las mismas regiones que las placas difusas pero además se encuentran en el cerebro medio, tronco del encéfalo y cerebelo. Asimismo, pueden aparecer placas de núcleo denso asociadas a axones o dendritas distróficas, hablándose en este caso de placas neuríticas (García-

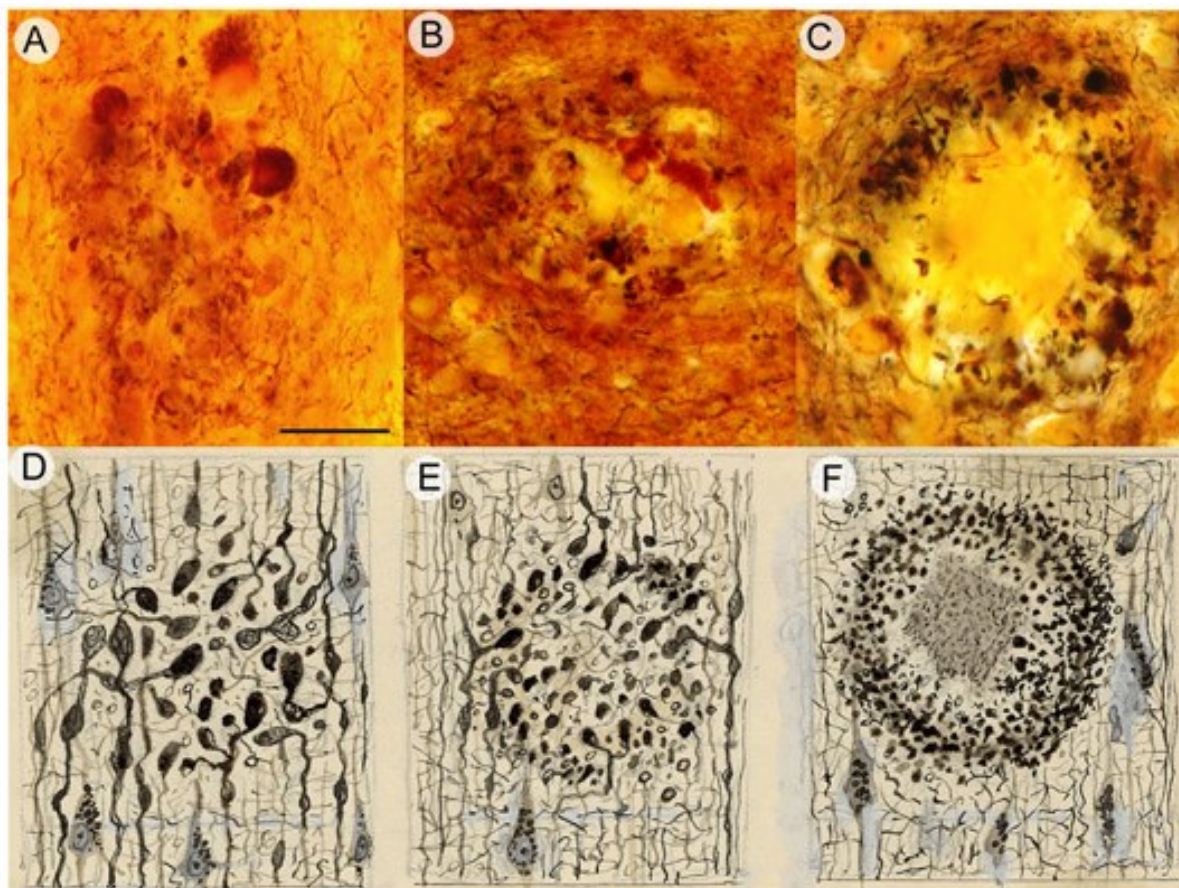


Figura 16. Preparaciones histológicas de placas seniles teñidas con el método de plata reducida (A-C) y dibujos (D-F) de placas seniles realizados por Santiago Ramón y Cajal (Legado Cajal, Instituto Cajal). Escala (en A): 25µm. Modificada de García-Marín *et al.*, 2007.

Marín *et al.*, 2007; Serrano-Pozo *et al.*, 2011; Thal *et al.*, 2006).

El patrón de distribución de las placas seniles comienza en la isocorteza y avanza hacia las allocortezas, ganglios basales, tronco del encéfalo y cerebelo. Así, se han propuesto dos patrones de distribución de las placas seniles, uno por Braak y Braak en 1991 y otro por Thal *et al.*, en 2002, comenzando ambos en la neocorteza (Figura 17 y 18; Braak y Braak, 1991; Thal *et al.*, 2002).

3.3.3. Relación entre la patología amiloide y la neurofibrilar

Aunque tanto la patología amiloide como la patología fibrilar son críticas en el desarro-

llo de la EA, se desconoce cómo están relacionados ambos mecanismos. En 1992, Hardy y Higgins propusieron la hipótesis de la cascada amiloide, posicionando el depósito y acumulación del péptido A β como el paso inicial en la patogénesis de la EA (Hardy y Higgins, 1992). La acumulación del péptido A β conduciría a su vez a la acumulación de proteína tau, pérdida sináptica y muerte neuronal, derivándose con ello los problemas cognitivos observados en los pacientes con EA. Esta teoría fue apoyada gracias a numerosos estudios genéticos que evidenciaban la importancia de la acumulación del péptido A β . Sin embargo, hoy en día, parece claro que la presencia de dicho péptido es necesaria para desencadenar el

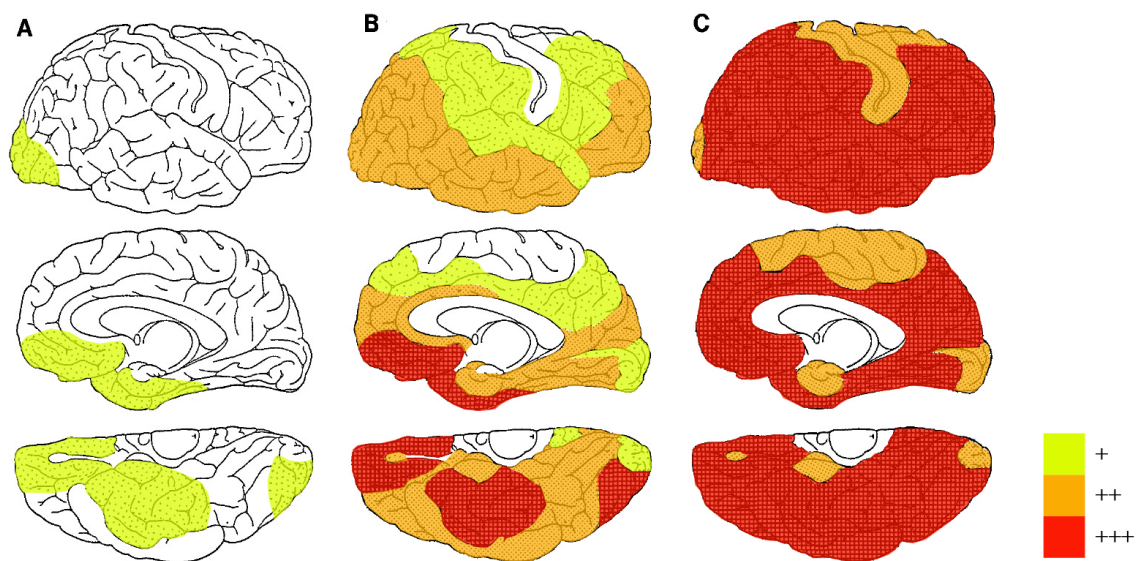


Figura 17. Esquema del patrón de distribución de las placas seniles propuesto por Braak y Braak (1991). En el estado A, las placas se empiezan a acumular en la neocorteza del lóbulo frontal, temporal y occipital. En el estado B, las placas se extienden hacia la formación del hipocampo y otras regiones corticales. En el estado C, todas las áreas isocorticales presentan una gran cantidad de placas, incluidas las áreas primarias, y además aparecen placas en regiones subcorticales y en el cerebelo. Modificada de Braak y Braak, 1991.

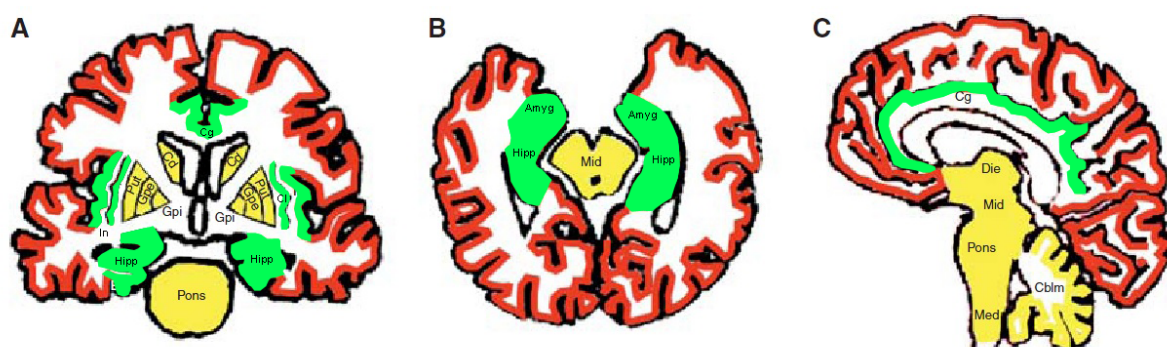


Figura 18. Esquema del patrón de distribución de las placas seniles propuesto por Thal *et al.*, (2002). Simplificado en tres estadios: primero, las placas comienzan a depositarse en áreas isocorticales (color rojo); a continuación, se propagan hacia áreas límbicas y allocortezas (color verde); al final, la progresión continúa hasta las estructuras subcorticales (color amarillo). A: corte coronal; B: corte axial; C: corte sagital. Amyg: amígdala; Hipp: hipocampo; Cg: corteza cingular; Cd: núcleo caudado; Put: núcleo putamen; Gpe: globo pálido externo; Gpi: globo pálido interno; Cl: claustrum; Ins: corteza insular; Die: diencefalo; Mid: cerebro medio; Med: médula oblonga; Cblm: cerebelo. Modificada de Serrano-Pozo *et al.*, 2011.

proceso neurodegenerativo pero no es suficiente por sí sola, de manera que coexistiría con otros factores implicados en el proceso degenerativo. Así, se han encontrado sujetos con placas seniles que no han presentado síntomas de demencia. Complementariamente, la correlación entre las fases de depósito de péptido A β y el déficit cognitivo característico de los pacientes con EA es mínima, aunque sí que hay estudios que han demostrado que formas oligoméricas solubles del péptido A β son capaces de inhibir la LTP de forma independiente a la acumulación de proteína tau (Lane *et al.*, 2018; Long y Holtzman, 2019).

Por otro lado, numerosos estudios han sugerido que la acumulación del péptido A β es necesaria para la progresión de la patología asociada a la proteína tau hiperfosforilada. De esta forma, estudios realizados en sujetos humanos han demostrado que la patología de tau no progresa desde la corteza entorrinal hacia las regiones neocorticales en ausencia de una coexistencia con la patología amiloide (Long y Holtzman, 2019). Finalmente, varios estudios han sugerido que el sistema inmune podría ser crítico en la patogénesis de la EA y constituir el nexo entre la patología amiloide y la patología neurofibrilar (Lane *et al.*, 2018).

3.4. Alteraciones de la conectividad sináptica

Numerosos estudios realizados en modelos animales de la EA y en muestras de tejido humano procedentes de pacientes con EA han reportado alteraciones de la conectividad sináptica en dicha enfermedad, tanto en la formación del hipocampo como en otras regiones corticales, donde ha sido

descrita una disminución en la densidad sináptica (Alonso-Nanclares *et al.*, 2013; Scheff *et al.*, 2006, 2007, 2011, 2015; Scheff y Price, 2003, 2006). Junto con la disminución en el número de sinapsis, se ha descrito también una disminución de la densidad neuronal (Gómez-Isla *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2001; Šimić *et al.*, 1997), encontrándose ambos tipos de alteraciones relacionadas con la presencia de la acumulación extracelular del péptido A β y la acumulación intracelular de la proteína tau hiperfosforilada (Gómez-Isla *et al.*, 1996; Van Hoesen *et al.*, 1991). De todas las marcas histopatológicas descritas en la EA, parece que la pérdida sináptica sería la que mejor correlacionaría con los déficits cognitivos observados en los pacientes con EA (Selkoe, 2002; Terry *et al.*, 1991), presentando más vulnerabilidad los circuitos glutamatérgicos excitatorios (Braak y Del Tredici, 2015; Kashani *et al.*, 2008; Llorens-Martín *et al.*, 2014) y viéndose primeramente afectadas las cortezas transentorrinal-entorrinales (Braak y Braak, 1991; 1992).

Además de la disminución en la densidad sináptica y neuronal, se han descrito cambios morfológicos sinápticos durante el desarrollo de la EA, como un incremento de la longitud de aposición sináptica, así como un incremento en el número de sinapsis con morfologías más complejas, postulándose ambos como posibles mecanismos compensatorios ante la pérdida sináptica en la EA (Alonso-Nanclares *et al.*, 2013; Anaya-Martínez *et al.*, 2014; Scheff *et al.*, 1990, 1996; Scheff y Price, 1993, 1998). También, se han descrito cambios morfológicos y disminución en el número de espinas dendríticas en modelos animales y en muestras de tejido humano procedentes de pacientes

Escala Thal	Fases de Thal	Cambios histopatológicos
A0	-	No presencia de placas A β
A1	Fases I o II	Placas A β en neocortex y regiones allocorticales
A2	Fase III	Placas A β en diencefalo, estriado y núcleos colinérgicos
A3	Fase IV o V	Placas A β en núcleos del tronco del encéfalo y cerebelo

Escala Braak	Estados de Braak	Cambios histopatológicos
B0	-	No presencia de NTFs
B1	Estados I-II	NTFs en corteza entorrinal y áreas relacionadas
B2	Estados III-IV	NTFs en hipocampo y amígdala
B3	Estados V-VI	NTFs en neocortex/corteza motora y sensorial

Escala CERAD	Puntuación CERAD	Cambios histopatológicos
C0	-	No placas neuríticas
C1	A	Pocas placas neuríticas
C2	B	Placas neuríticas moderadas
C3	C	Placas neuríticas frecuentes

Tabla 1. Cambios neuropatológicos producidos en la EA categorizados según la “Escala ABC”. Modificada de Hyman *et al.*, 2012.

con EA en la vecindad de placas de A β (Knafo *et al.*, 2009; Llorens-Martín *et al.*, 2014; Merino-Serrais *et al.*, 2011; Pozueta *et al.*, 2013; Spires-Jones *et al.*, 2007; Tackenberg *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2015), así como cambios en las espinas dendríticas relacionados con la presencia de proteína tau hiperfosforilada (Merino-Serrais *et al.*, 2013; Pozueta *et al.*, 2013; Tackenberg *et al.*, 2009). Dado que la integridad de las espinas dendríticas es fundamental para la

estabilidad y el correcto funcionamiento de las sinapsis, y que las espinas dendríticas constituyen el lugar donde se producen la mayoría de los contactos sinápticos excitadores, la pérdida o cambio morfológico de dichas espinas se relaciona con alteraciones de conectividad. Si estos cambios afectan al circuito implicado en aprendizaje y memoria, entonces se producirán problemas cognitivos, como los producidos durante la EA (Herms y Dorostkar, 2016).

A: presencia de placas A β (Escala Thal)	C: presencia de placas neuríticas (Escala de CERAD)	B: presencia de NTFs (Escala de Braak)		
		B0 o B1 (Estados I-II)	B2 (Estados III-IV)	B3 (Estados V/VI)
A0	C0	Nulo	Nulo	Nulo
A1 (Fases I-II)	C0 o C1 (Sin placas o pocas placas)	Bajo	Bajo	Bajo
	C2 o C3 (Placas moderadas o frecuentes)	Bajo	Intermedio	Intermedio
A2 (Fase III)	No C	Bajo	Intermedio	Intermedio
A3 (Fases IV-V)	C0 o C1 (Sin placas o pocas placas)	Bajo	Intermedio	Intermedio
	C2 o C3 (Placas moderadas o frecuentes)	Bajo	Intermedio	Alto

Tabla 2. Escala ABC de decisión de probabilidad de diagnóstico de la EA. A: presencia de placas según la clasificación de Thal (2002). B: presencia de NTFs según la clasificación de Braak (1991). C: presencia de placas neuríticas según la clasificación de CERAD. Modificada de Hyman *et al.*, 2012.

3.5. Diagnóstico y Tratamiento

El diagnóstico definitivo de la EA se realiza *postmortem* en función de las alteraciones neuropatológicas. Dichas alteraciones se evalúan mediante lo que se denomina escala ABC, la cual valora tres parámetros: presencia de proteína amiloide (A: escala Thal); presencia y distribución de NTFs (B: escala Braak); presencia y distribución de placas seniles (C: escala CERAD; Tabla 1; Braak y Braak, 1991; Mirra *et al.*, 1991; Thal *et al.*, 2002). La combinación de los tres parámetros permite el establecimiento de una probabilidad nula, baja, intermedia o alta de EA (Tabla 2; Hyman *et al.*, 2012). Aunque el diagnóstico definitivo de la EA se realiza *postmortem*, numerosos estudios han demostrado que se puede realizar un diagnós-

tico neuropatológico bastante acertado *an-temortem* analizando la presencia de biomarcadores, como son el depósito de péptido A β o proteína tau, en el líquido cefalorraquídeo o mediante la aplicación de resonancia magnética de emisión de positrones (Long y Holtzman, 2019).

A día de hoy, no hay disponibles tratamientos que modifiquen el curso y avance de la EA. Están aprobados cuatro medicamentos que intentan solventar los problemas cognitivos en pacientes de EA sintomáticos, principalmente mediante la compensación de la alteración de los neurotransmisores. Así, hay tres inhibidores de la acetilcolinesterasa (donezepilo, rivastigmina y galantamina) que ponen el foco en incrementar la cantidad de acetilcolina disponible en la sinapsis impidiendo su degradación. Junto con los

inhibidores de la acetilcolinesterasa se usa un cuarto medicamento (memantina) que es un antagonista de baja afinidad del receptor de glutamato NMDA. Mediante su acción, permite reducir la excitotoxicidad mediada por glutamato en la sinapsis sin interferir en su función fisiológica normal. Todos estos medicamentos han mostrado una leve mejora de los problemas cognitivos en pacientes con EA moderada-severa, sin embargo, su efecto global es bastante bajo. Por ello, es necesario un cambio de enfoque en la aproximación y desarrollo de nuevos fármacos, con un enfoque multidisciplinar y no sólo farmacológico y, a ser posible, teniendo en cuenta cada paciente individual y sus circunstancias personales.

Actualmente se están desarrollando nuevas estrategias enfocadas a intentar prevenir o eliminar la formación de placas seniles mediante inmunoterapia en fases preclínicas de la enfermedad. Otras estrategias están enfocadas en la patología fibrilar y la respuesta neuroinflamatoria. Además, se está poniendo mucho esfuerzo en la detección de nuevos biomarcadores cuya presencia pueda ser detectada en el líquido cefalorraquídeo, muestras de sangre o mediante resonancia magnética, y que permitan detectar individuos en riesgo de desarrollo de la enfermedad, para poder así intentar prevenir su desarrollo (Lane *et al.*, 2018; Long y Holtzman, 2019).

II. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis doctoral es describir la microanatomía de la capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE humana en condiciones normales, así como sus posibles alteraciones en la EA. Concretamente, los objetivos específicos son:

1. Estudio histopatológico de la CTE y la CE
 - a) Análisis histopatológico y grosor cortical
 - b) Determinación del volumen ocupado por los diferentes elementos corticales (neurona, glía, vasos sanguíneos y neuropilo)
2. Estudio ultraestructural del neuropilo de la capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE
 - a) Estimación de la densidad sináptica
 - b) Estimación de la proporción de sinapsis excitadoras e inhibitoras
 - c) Análisis de la distribución sináptica espacial 3D
 - d) Determinación del volumen ocupado por las mitocondrias
3. Estudio ultraestructural de las características morfológicas de las sinapsis
 - a) Tamaño de las sinapsis
 - b) Forma de las sinapsis: categorización como maculares, perforadas, herraduras y fragmentadas
 - c) Relación entre el tamaño y la forma de las sinapsis
4. Estudio de la distribución de las sinapsis en el neuropilo
 - a) Determinación de los diferentes elementos postsinápticos (espinas y dendritas) y análisis de sus proporciones
 - b) Relación entre el tamaño de las sinapsis y los diferentes elementos postsinápticos

Todos los objetivos específicos han sido realizados tanto en las muestras control como en las muestras de tejido procedente de pacientes con EA, llevándose a cabo por un lado un estudio descriptivo de la ultraestructura de la capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE humana, y por otro lado un estudio de las posibles alteraciones ultraestructurales de dichas capas y regiones en la EA.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PREPARACIÓN DEL TEJIDO

1.1. Obtención del tejido

Las muestras de tejido cerebral humano utilizadas en este estudio procedieron de tres centros: el Servicio de anatomía Patológica del Instituto de Neuropatología del IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge (Dr. I. Ferrer, Barcelona, España); el Banco de Tejidos del Centro Alzheimer Fundación Reina Sofía (Dr. A. Rábano, Área de Neuropatología, Centro Alzheimer, Fundación CIEN, Madrid, España) y la Unidad Asociada Neuromax —Laboratorio de Neuroanatomía Humana de la Universidad de Albacete (Dr. R. Insausti, Albacete, España). Todas ellas fueron obtenidas siguiendo las normas del Comité Ético Institucional para el uso de muestras humanas con propósitos de investigación biomédica.

Las muestras de autopsias fueron clasificadas como control (sujetos no dementes sin alteraciones neurológicas conocidas) o EA, según el criterio neuropatológico de los centros mencionados. Se obtuvieron muestras de 6 casos control y de 6 pacientes con EA. En todos los casos, el tiempo *postmortem* fue inferior a 5h (Tabla 3).

Una vez extraído el encéfalo, fue sumergido en paraformaldehído (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU) al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1M pH 7.4 (Panreac, 131965, España). A continuación, se obtuvieron pequeños bloques (aproximadamente 10 x 10 x 10mm) de la región de interés que se post-fijaron mediante inmersión en la misma solución fijadora durante 24-48h a 4°C. Después de la fijación, el tejido fue lavado en PB y cortado en secciones coronales de 50 y 150µm con vibratomo (Vibratome Sectio-

ning System, 1000 plus, Vibratome, PELCO, España). Sólo se seleccionaron para el presente estudio aquellas secciones que contenían CTE y/o CE (Tabla 3, Figura 3).

1.2. Procesamiento del tejido para inmunohistoquímica

Las secciones escogidas para inmunohistoquímica se trataron durante 30min con agua oxigenada (Panreac, 141076, España) al 2% para eliminar la peroxidasa endógena. Posteriormente, las uniones inespecíficas fueron bloqueadas durante 1h con 0.25% Tritón-X100 (Merck, 8603, Alemania) en PB 0.1M y suero de caballo al 3% (Vector, S-2000, EEUU). Las secciones fueron incubadas durante 24h a 4°C con los anticuerpos frente a la proteína específica neuronal (NeuN; 1:2000; Chemicon; MAB377, Temecula, EEUU), y frente a dos isoformas de la proteína tau constituyente de ovillos intracelulares: PHF-Tau-AT8 (anti-Tau monoclonal, 1:2000; Invitrogen, MN1020, EEUU) y PHF-Tau-PHF1 (anti-Tau pS396 policlonal, 1:2000; Invitrogen, 44752G, EEUU). Las secciones seleccionadas para incubar con el anticuerpo contra el péptido Aβ para marcar placas seniles fueron primero tratadas con ácido fórmico al 88% (Sigma-Aldrich, No. 251364, St. Louis, MO, EEUU) para asegurar el marcaje específico y, posteriormente, fueron incubadas en una solución con el anticuerpo contra péptido Aβ (clon 6F/3D; 1:50, Dako M0872, Glostrup, Alemania).

Finalmente, las secciones se trataron con un anticuerpo secundario biotinilado (1:200, Vector, BA-2020, BA-9400, EEUU), y después, con el Complejo de Avidina-Biotina-Peroxidasa (1:125, Vectastain ABC

Paciente	Sexo	Edad (Años)	Causa Muerte	Tiempo Post-mortem (h)	Escala Braak	Escala CERAD	Diagnóstico Neuropsicológico	CTE	CE
AB1	Hombre	45	Mesotelioma pleural	<1	0	0	No evidencia de demencia	✓	✓
AB2	Mujer	53	Shock origen pulmonar	4	0	0	No evidencia de demencia	✓	
AB3	Hombre	53	Carcinoma de vejiga	3.5	0	0	No evidencia de demencia		✓
IF10	Hombre	66	Neumonía bilateral + postransplante cardíaco	2	0	0	No evidencia de demencia	✓	✓
M16	Hombre	40	Accidente de tráfico	3	0	0	No evidencia de demencia	✓	✓
M17	Hombre	36	Bronconeumonía	2.5	0	0	No evidencia de demencia	✓	
IF1	Mujer	80	-	2	IV	B	No evidencia de demencia	✓	✓
IF2	Mujer	94	Tuberculosis pulmonar	1.5	V	C	Demencia	✓	
IF6	Hombre	85	Neumonía	2	III	A	Deterioro cognitivo leve	✓	
VK11	Mujer	87	Infección respiratoria	1.5	III-IV	A	Demencia	✓	✓
VK16	Mujer	88	-	2.5	VI	C	Demencia		✓
VK22	Mujer	86	-	2	V	C	Demencia	✓	✓

Tabla 3. Información clínica y neuropatológica de los casos de estudio. Escala de Braak (Braak y Braak, 1991): 0 (ausencia de NTFs); III (NTFs en corteza entorrinal y áreas cercanas); III-IV (NTFs en amígdala e hipocampo y extendidos en cortezas de asociación); V-VI (NTFs distribuidos a través del neocórtex y, en último término, en corteza primaria motora y áreas sensoriales). Escala de CERAD (Mirra *et al.*, 1991): 0 (ausencia de placas neuríticas); A (baja densidad de placas neuríticas); B (densidad intermedia de placas neuríticas); C (alta densidad de placas neuríticas). - : no disponible; ✓: muestra disponible.

Kit; Vector, PK-6100, EEUU) durante 1h. Las secciones fueron reveladas utilizando 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro como cromógeno (Sigma, D-5905, EEUU), deshidratadas, aclaradas con xilol (Panreac, 141769, España) y montadas con medio de montaje DePeX (Merck, HX55746679, Alemania).

1.3. Procesamiento del tejido para microscopía electrónica

Las secciones seleccionadas para microscopía electrónica fueron post-fijadas en una solución de 2% paraformaldehído, 2.5% glutaraldehído (TAAB, G002, Reino Unido) y CaCl_2 (Sigma, C-2661-500G, Alemania) al 0.003% en tampón cacodilato (sodio cacodilato, Sigma, C0250-500G, Alemania) al 0.1M. Después de la post-fijación, las secciones fueron lavadas en tampón cacodilato 0.1M y tratadas durante 1h en una solución de OsO_4 (Sigma, O5500, Alemania) al 1%, ferrocianuro (potasio de ferrocianuro 3-hidrato, Probus, 23345, España) al 0.1% y CaCl_2 al 0.003% en tampón cacodilato 0.1M. Seguidamente, las secciones fueron lavadas con tampón cacodilato 0.1M y tratadas durante 1h en una solución de OsO_4 al 1% y CaCl_2 al 0.003% en tampón cacodilato 0.1M. A continuación, las secciones fueron lavadas en tampón cacodilato 0.1M y tratadas durante aproximadamente 3min con acetato de uranilo (EMS, 8473, EEUU) al 2% en soluciones crecientes de etanol (Merck, 32221, Alemania). Posteriormente, las secciones fueron deshidratadas y embebidas en araldita (TAAB, E021, Reino Unido), pasando primero por una solución de araldita-acetona 1:1, araldita-acetona 4:1 y araldita

pura. Finalmente, dichas secciones fueron incluidas en plano en araldita pura durante 48h a 60°C (DeFelipe y Fairen, 1993).

Las secciones incluidas en plano fueron pegadas en un bloque de araldita y talladas, seleccionando solo la parte de la sección que contuviese el área cerebral de interés. Después, para poder localizar las capas de interés, se obtuvieron series de cortes semifinos (1-2 μm) de la superficie del bloque con el ultramicrotomo (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se tiñeron con azul de toluidina (Merck, 115930, Alemania) al 1% en borato de sodio al 1% (sodio tetraborato 10 hidrato; bórax, Panreac, 141644, España). El último semifino (que se corresponde con la sección inmediatamente adyacente a la superficie del bloque) fue analizado en el microscopio óptico y fotografiado para determinar con precisión la zona de neuropilo a analizar (Figura 19).

El bloque con el tejido fue pegado en soportes de carbón conductor, y toda la superficie del bloque de araldita, excepto la superficie a estudiar, fue cubierta con plata (Merck, 1512, Alemania). La superficie a estudiar se cubrió con oro/paladio mediante un pulverizador catódico (Quorum Technologies, SC502-314B, Reino Unido) para facilitar la disipación de la carga.

2. MICROSCOPIA ÓPTICA

2.1. Estimación de la fracción de volumen de los elementos corticales

Para estimar la fracción de volumen (V_v) ocupada por el neuropilo, cuerpos celulares (neuronas y glia) y vasos sanguíneos se usaron entre 3 y 5 semifinos (1-2 μm) de todos los casos teñidos con azul de toluidina. La

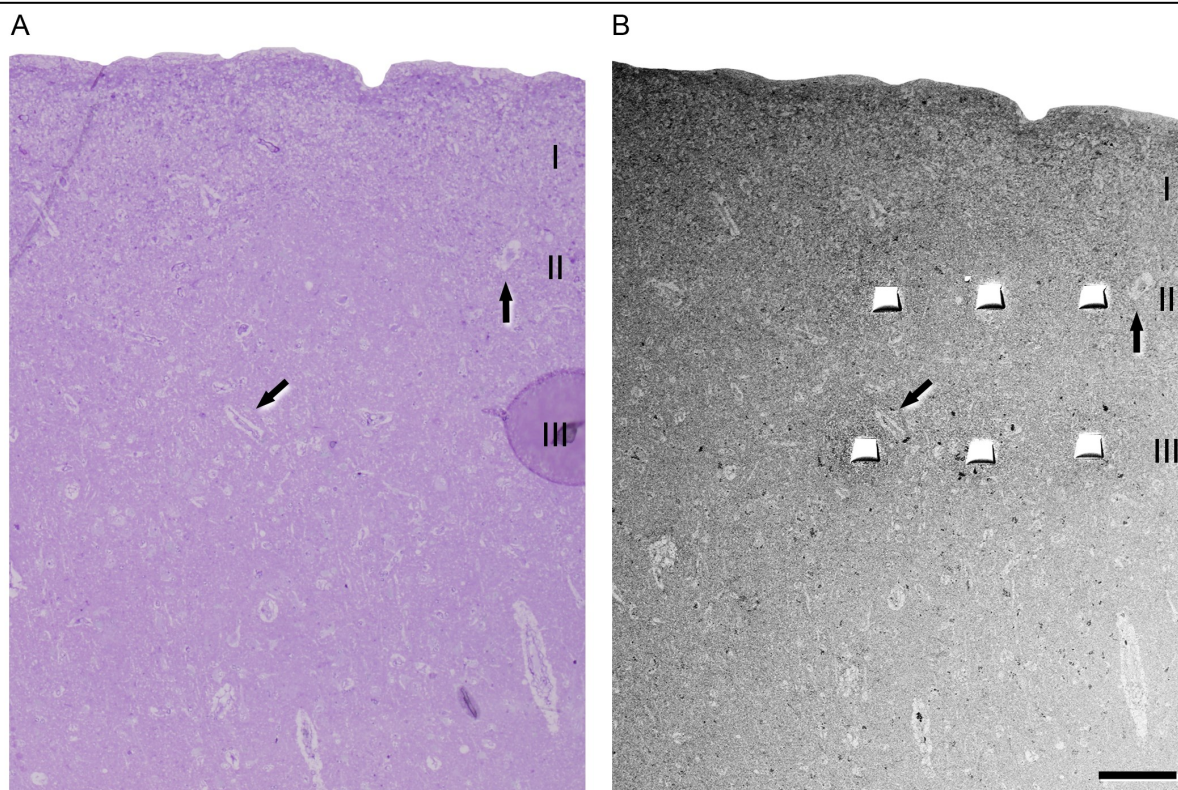


Figura 19. Microfotografía de una sección semifina (2 μm) de la CE humana. A: Fotografía de un corte semifino (2 μm) teñido con azul de toluidina mostrando las capas II y III de la CE en un sujeto con EA (VK11). B: Fotografía de la superficie del bloque de tejido embebido en araldita tomada con el SEM y que se corresponde al mismo campo microscópico que en la fotografía del corte semifino mostrada en A. En este panel se muestran las trincheras obtenidas con el haz de galio (FIB). Las flechas en A y en B indican dos vasos sanguíneos para facilitar la orientación en el tejido en el microscopio electrónico. Escala (en B): 100 μm .

estimación de la fracción de volumen en la CTE fue realizada aplicando el principio de Cavalieri (Gundersen *et al.*, 1988), y usando para ello el programa Stereo Investigator (Version 8.0, MicroBrightField Inc., VT, USA) acoplado a un microscopio óptico Olympus (Olympus, Bellerup, Denmark) con una magnificación de 40X. Tras la realización de un estudio piloto, sobre cada semifino se superpuso una gradilla con un área asociada de 400 μm^2 . El número de puntos de la gradilla que tocan el objeto de interés dividido entre el número de puntos totales que se encuentran en el área de referencia es proporcional a la fracción de volumen ocupada por dicho objeto (Gundersen *et al.*, 1988). V_v fue estimada con la siguiente fórmula:

$V_v \text{ neuropilo} = 100 - (V_v \text{ neuronas} + V_v \text{ glia} + V_v \text{ vasos sanguíneos}; \text{Figura 20})$. En el caso de la CE, la estimación de la fracción de volumen ocupada por los diferentes elementos corticales fue realizada mediante la aplicación del principio de Area Fraction Fractionator, usando para ello el programa Stereo Investigator (Version 8.0, MicroBrightField Inc., VT, USA) acoplado a un microscopio óptico Olympus (Olympus, Bellerup, Denmark) con una magnificación de 40X. Así, tras la realización de un estudio piloto, se trazaron los contornos de las dos capas de estudio en los cortes semifinos de CE y en ellos se distribuyeron los marcos estereológicos de conteo con unas dimensiones de 20x20 μm . En cada marco de con-

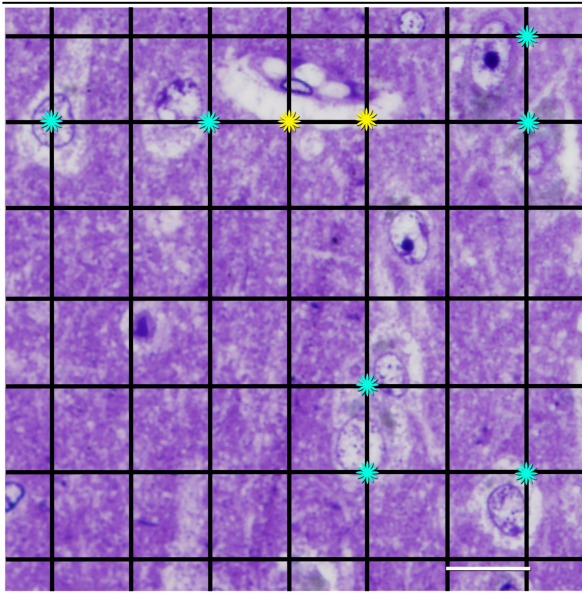


Figura 20. Fotografía de un corte semifino ($2\mu\text{m}$) teñido con azul de toluidina de un sujeto control (AB2) ilustrando la estimación de la fracción de volumen de los diferentes elementos corticales mediante el método de Cavalieri. Sobre el corte semifino se superpone una gradilla con un área asociada de $20 \times 20 = 400\mu\text{m}^2$. Los asteriscos azules muestran la intersección de la gradilla con los somas neuronales. Los asteriscos amarillos muestran la intersección de la gradilla con un vaso sanguíneo. Barra de escala: $20\mu\text{m}$.

teo se dispuso una gradilla de tal forma que se pudo identificar y clasificar cada uno de los elementos corticales que tocaban la misma, obteniéndose la fracción de volumen ocupada por cada uno de los elementos estudiados.

2.2. Estimación del encogimiento del tejido

El procesamiento de las muestras para microscopía electrónica produce modificaciones físicas en las secciones que resultan en una retracción o encogimiento de sus dimensiones. Este encogimiento fue estimado midiendo el área de las secciones antes y después del procesamiento (Merchán-Pérez *et al.*, 2009). De esta forma, el valor de la superficie de la muestra después del procesamiento fue dividido entre el valor del área de la muestra antes del procesamiento, obteniéndose un factor de encogimiento del área ($p^2 = 0.933$). Los factores de encogimiento para volumen y longitud fueron $p^3 = 0.900$ y $p = 0.966$, respectivamente. Todos los datos procedentes del estudio de mi-

croscopía electrónica fueron corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Además, todas las series de imágenes fueron corregidas para la presencia de artefactos derivados de los procesos de fijación. El volumen ocupado por estos artefactos se estimó mediante el método de Cavalieri (Gundersen *et al.*, 1988), descontado del volumen de cada serie de imágenes para evitar una infra-estimación del número de sinapsis por volumen. Los datos de densidades sinápticas fueron corregidos acorde-

Finalmente, entre 3 y 5 semifinos por caso, teñidos con azul de toluidina que contenían todas las capas de cada región, se utilizaron para medir el grosor, tanto de la CTE como de la CE. Dicho grosor se estimó mediante 3 medidas de la distancia desde la superficie pial hasta la sustancia blanca en cada uno de los semifinos, obteniéndose después la media en cada sujeto de estudio. Estas medidas fueron tomadas con la ayuda del programa Fiji (ImageJ 1.51; NIH, EEUU; <http://imagej.nih.gov/ij/>).

3. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

3.1. Microscopía electrónica tridimensional (FIB/SEM)

El estudio 3D de las muestras se realizó mediante un microscopio de doble haz, en inglés “*Focus Ion Beam/Scanning Electron Microscope*” (FIB/SEM; Crossbeam® 540 EsB, Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania). Este microscopio combina una columna de emisión SEM (Gemini® column, Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Alemania) de alta resolución con un haz de iones de galio (FIB) que permite eliminar material de la muestra en una escala de nanómetros. Cuando la capa de material es eliminada por el FIB, la superficie que queda expuesta es fotografiada por el SEM, usando para ello un detector de electrones de retrodispersión. De esta forma, el uso automático y secuencial del pulido del FIB y el escaneo del SEM permite la obtención de largas series de fotografías de la región de interés, proporcionando información de la muestra en 3D (Blazquez-Llorca *et al.*, 2013).

Las imágenes se obtuvieron con una resolución de 5nm/pixel en el plano xy, y 20nm (equivalente al grosor de cada sección) en el plano z, siendo el tamaño de la imagen 2048 x 1536 pixels. En el caso de las muestras procedentes de la CTE, el número de fotografías de cada serie de imágenes fue de entre 149 y 472 fotografías, lo que se corresponde con un volumen estudiado de entre 260.2 y 824.4 μm^3 (media: 524,5 μm^3 ; total: 15726.7 μm^3). En total, se obtuvieron 30 series de imágenes del neuropilo de la capa II de la CTE (3 series de imágenes por caso, en el total de los 10 casos), evitando la presencia de somas celulares y vasos san-

guíneos. Para asegurar que todas las imágenes se obtuvieron de la misma capa cortical en todas las muestras, se estimó una distancia de entre 267–506 μm desde la capa I hasta la primera fila de células en la capa II.

En el caso de las muestras procedentes de la capa II de la CE, el número de fotografías de cada serie de imágenes fue de entre 244 y 341 fotografías, correspondiéndose con un volumen estudiado de entre 383.8 μm^3 y 536.6 μm^3 (media: 466.2 μm^3 ; total: 11187.8 μm^3). En total, se obtuvieron 24 series de imágenes del neuropilo de la capa II de la CE (3 series de imágenes por caso, 12 series de imágenes de muestras de sujetos control y 12 series de imágenes de muestras de sujetos con EA). En el caso de las muestras procedentes de la capa III de la CE, el número de fotografías de cada serie de imágenes fue de entre 126 y 405 fotografías, correspondiéndose con un volumen estudiado de entre 198.2 μm^3 y 637.0 μm^3 (media: 463.3 μm^3 ; total: 11118.6 μm^3). En total, se obtuvieron 24 series de imágenes del neuropilo de la capa III de la CE (3 series de imágenes por caso, 12 series de imágenes de muestras de sujetos control y 12 series de imágenes de muestras de sujetos con EA).

3.2 Análisis sináptico tridimensional

Las series de imágenes obtenidas con el microscopio FIB/SEM se alinearon aplicando un método de traslación y no rotación, para evitar la deformación de las imágenes, usando para ello el programa Fiji. Para facilitar la posterior segmentación de las imágenes, se aplicó a todas ellas un filtro *Gaussian Blur*.

Seguidamente, todas las series de imágenes fueron analizadas utilizando el software EspINA (*Espina Interactive Neuron Analyzer*, 2.1.7), el cual permite realizar una segmentación 3D semiautomática de las estructuras de interés, en este caso, las sinapsis. El programa aprovecha que las densidades sinápticas (especialmente la postsináptica) son electrodensas, de tal forma que utiliza un umbral de grises para extraer los voxels que se corresponden con los niveles de grises que corresponden a la unión sináptica (Morales *et al.*, 2011). Dado que las uniones sinápticas son completamente reconstruidas en 3D, cada sinapsis puede ser clasificada como SA o SS en función de lo prominente o delgada que sea su PSD, respectivamente (Figura 21; Gray, 1959a; Peters y Palay, 1996). Puesto que EspINA permite la aplicación de un marco estereológico 3D en el volumen estudiado, la densidad sináptica se puede obtener mediante una estimación directa del número de sinapsis por volumen (Figura 22).

3.3. Morfología sináptica: Superficie Sináptica de Aposición

Como las membranas pre y postsinápticas están muy juntas y localizadas cara a cara, sus áreas son muy similares, y ambas estructuras pueden ser simplificadas en una única estructura que representa la superficie de aposición entre la zona activa y la PSD, y que es denominada superficie sináptica de aposición (*Synaptic Apposition Surface*, SAS; Morales *et al.*, 2013). Mediante el software EspINA se obtuvieron las SAS de todas las sinapsis identificadas. Debido a que el tamaño de la zona activa se relaciona

con la probabilidad de liberación del neurotransmisor, y la PSD con el número de receptores postsinápticos, el área de la SAS es una medida funcionalmente relevante del tamaño de la sinapsis. Una vez obtenida la SAS, se extrajeron las características geométricas de las sinapsis, como el área y perímetro de la SAS, obteniendo de esta forma información del tamaño y morfología de las sinapsis.

Además, las SAS se visualizaron en 3D para identificar la presencia de perforaciones o hendiduras en las mismas. Así, las sinapsis se clasificaron en función de su morfología en: macular (PSD continua en forma de disco), perforada (PSD con una o varias perforaciones), herradura (PSD con hendidura) o fragmentada (dos o varias PSDs diferenciadas; Santuy *et al.*, 2018a; Figura 10).

3.4. Determinación de elementos postsinápticos

Para poder realizar la identificación de los elementos postsinápticos se utilizó EspINA para navegar a través de las series de imágenes, determinando así si las sinapsis se establecían sobre tallos dendríticos o espinas dendríticas. Para poder determinar con precisión una espina dendrítica, es necesario que esté completa, de tal forma que se pueda seguir visualmente hasta el tallo dendrítico del que emerge. Aquellos elementos que se encontraron cerca del borde de la serie de imágenes y aparecían truncados o no se pudieron identificar con seguridad se etiquetaron como “desconocidos”. En los casos en los que las sinapsis se establecieron sobre tallos dendríticos, se diferenció entre tallos dendríticos con espinas (cuando

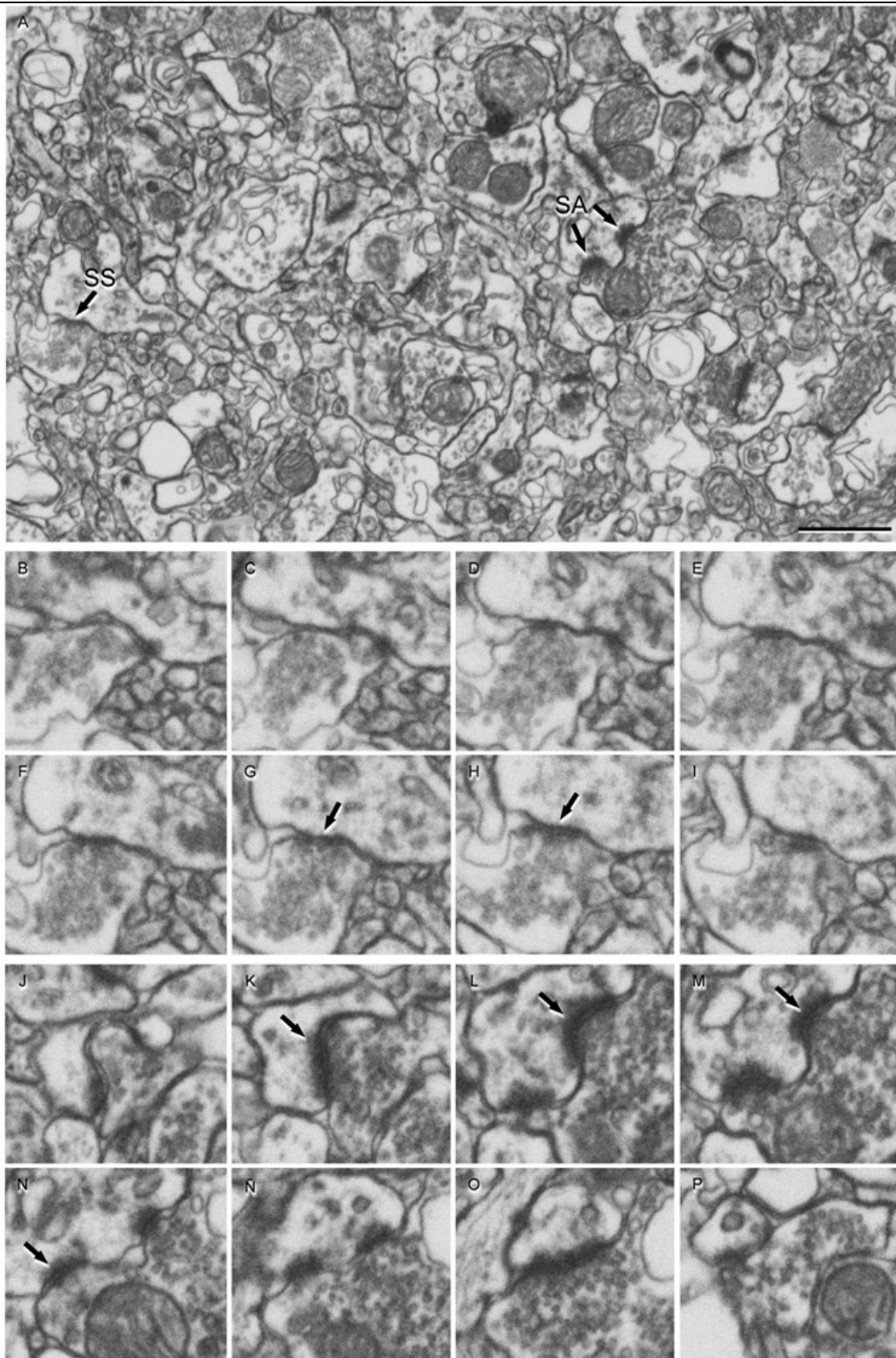


Figura 21. Serie de imágenes del neuropilo de la capa II de la CTE obtenidas con el microscopio FIB/SEM procedentes de una muestra de un sujeto con EA (IF6). **A:** Fotografía a menor aumento donde se muestran numerosas sinapsis, de las cuales se han elegido una como ejemplo de SA (indicada con dos flechas) y otra como ejemplo de SS (indicada con una flecha). SS mostrada a mayor aumento (B-I). SA mostrada a mayor aumento (J-P). Escala (en A): 1000nm en A; 500nm en B-P.

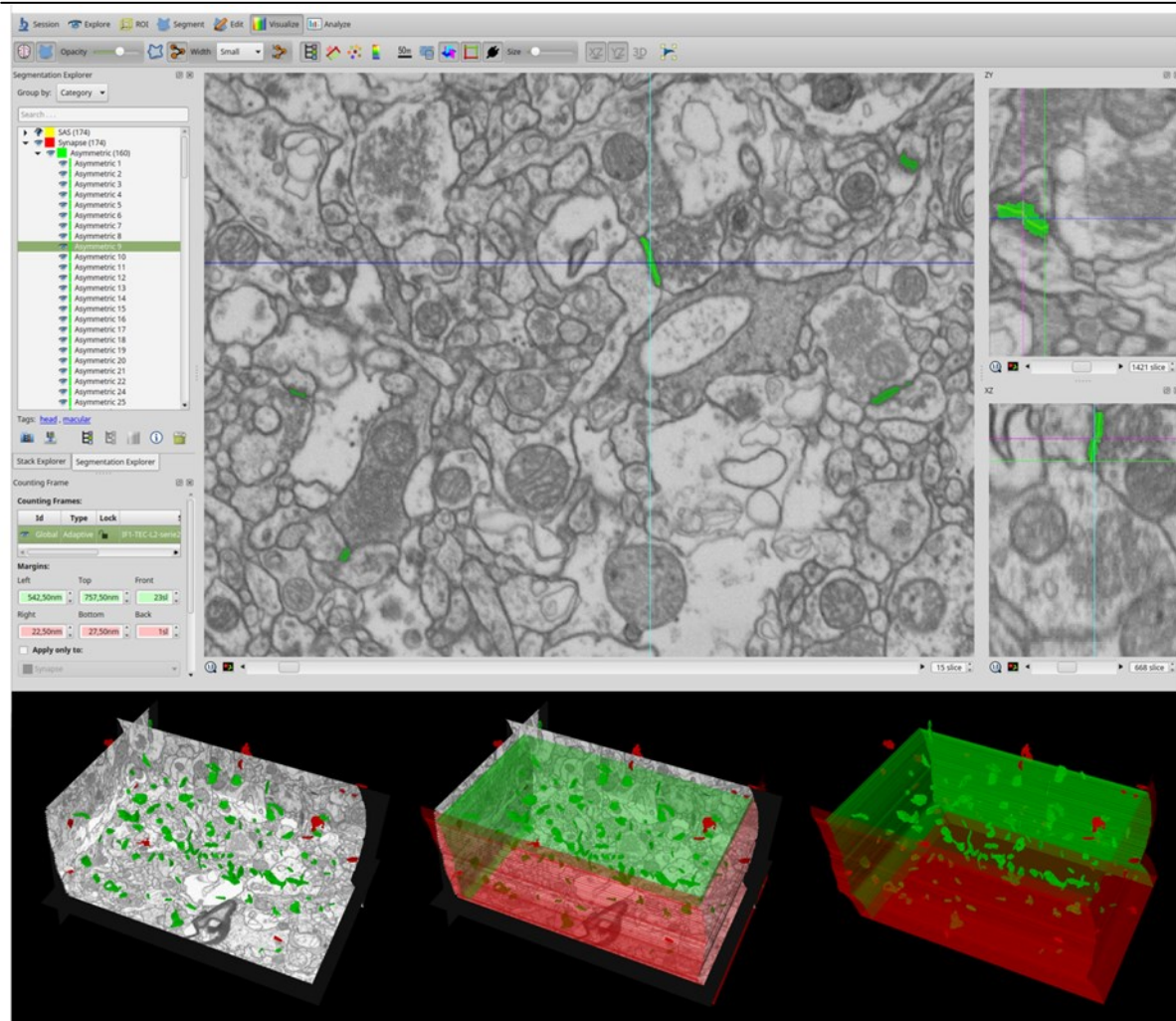


Figura 22. Screenshot de la interface del software EspINA. En la pantalla principal (arriba) se puede observar la imagen de microscopia electrónica en el plano xy, tal y como se obtiene con el microscopio FIB/SEM. Los otros dos planos ortogonales (yz y xz) se muestran en las dos ventanas adyacentes al plano principal (a la derecha). En la parte de debajo de la figura se muestra la ventana 3D con los tres planos ortogonales y las reconstrucciones en 3D de las sinapsis segmentadas. Además, puede visualizarse el marco estereológico 3D con los tres planos de inclusión en verde y los tres planos de exclusión en rojo. Las sinapsis que quedan dentro del marco estereológico o tocan los planos de inclusión se han representado en verde; las sinapsis que quedan fuera del marco estereológico o tocan los planos de exclusión han sido representadas en rojo.

se veían espinas emergiendo del mismo) o sin espinas (cuando dentro del volumen de la serie de imágenes no aparecían espinas surgiendo del tallo). Las sinapsis establecidas sobre espinas dendríticas se diferenciaron entre aquellas realizadas sobre la cabeza de la espina o sobre el cuello de la misma. Se determinó también la presencia de una o más sinapsis en la misma cabeza (Santuy *et al.*, 2018b). Así se estableció una

clasificación de todas las sinapsis en las que el elemento postsináptico pudo ser claramente identificado en 4 grupos: cabeza de espina dendrítica, cuello de espina dendrítica, tallo dendrítico con espinas y tallo dendrítico sin espinas.

3.5. Distribución tridimensional de la sinapsis

Para analizar la distribución espacial de las sinapsis se aplicó una técnica estadística denominada "*Spatial Point Process*" (proceso de punto espacial), que permite la caracterización de patrones de distribución espacial. Brevemente, las posiciones reales de las sinapsis (dadas por sus centroides obtenidos mediante EspINA) se compararon con el patrón de distribución espacial aleatoria *Complete Spatial Randomness* (CSR), el cual asume que cualquier punto del espacio tiene la misma probabilidad de ocupar cualquier posición en un determinado volumen. Para cada una de las series de imágenes se calcularon las funciones G, F y K, comúnmente utilizadas en este tipo de análisis de distribución espacial (Blazquez-Llorca *et al.*, 2015). Además, de cada serie de imágenes se obtuvo la distancia al vecino más cercano de cada una de las sinapsis. Ambas aproximaciones fueron realizadas usando el programa R y el paquete Spatstat (The R Foundation for Statistical Computing. versión 3.3.3. <https://www.r-project.org/>).

3.6. Estimación de la fracción de volumen mitocondrial

La estimación de la fracción de volumen mitocondrial (V_m) se estableció aplicando el método de Cavalieri (Gundersen *et al.*, 1988) en las imágenes obtenidas de las series del FIB/SEM. Tras la realización de un estudio piloto donde se ajustaron los parámetros, se utilizó una gradilla con un área por punto de 400000nm^2 y se analizaron una de cada 20 imágenes ($z=400$). Este análisis fue realizado con el paquete de herramientas "Stereology" (Mironov, 2017) del software Fiji (Figura 23).

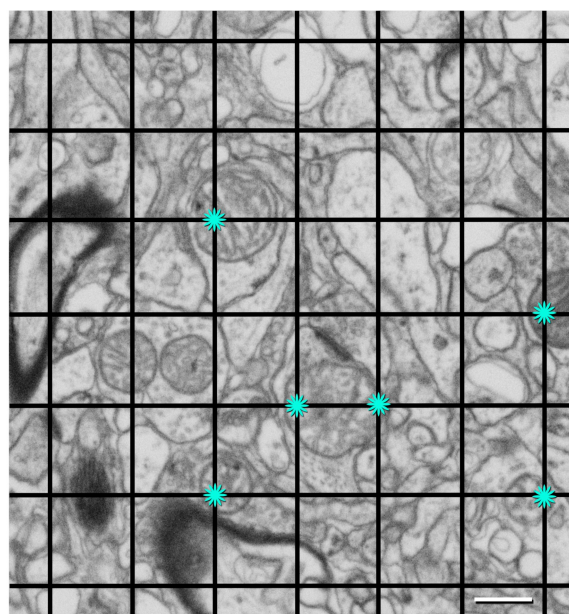


Figura 23. Estimación mediante el método de Cavalieri de la fracción de volumen ocupada por las mitocondrias en el neuropilo. Microfotografía obtenida con el FIB/SEM mostrando el neuropilo la capa III de la CE de un sujeto con EA (IF1). Sobre fotografía de microscopía electrónica se superpone una gradilla con un área asociada de 400000nm^2 . Los asteriscos azules muestran la intersección de la gradilla con las mitocondrias. El número de intersecciones que tocan mitocondrias se dividen entre el número total de intersecciones. Este cociente es proporcional a la fracción de volumen del neuropilo ocupada por las mitocondrias. Barra de escala: 500nm.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En los casos en los que los datos no cumplieron los criterios de normalidad y homocedasticidad (homogeneidad de varianzas) se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney (MW), para determinar las posibles diferencias entre el grupo control y el grupo con EA en relación a la densidad sináptica, grosor de la región estudiada, tamaño sináptico (SAS), fracciones de volumen de los diferentes elementos del neuropilo, así como la distancia al vecino más cercano. En los casos en los que los datos cum-

plieron los criterios de normalidad y homocedasticidad se empleó el test paramétrico t-test.

Para evaluar las diferencias de tamaño sináptico (área y perímetro de las SAS) en función de su categoría morfológica (macular, perforada, herradura o fragmentada) o de su diana postsináptica (espinas o tallos dendríticos) dentro de un mismo grupo, se utilizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis (KW) o el test paramétrico ANOVA. Los análisis de posibles diferencias en las distribuciones de frecuencia de las SAS se realizaron mediante la aplicación del test no paramétrico Kolmogorov-Smirnov (KS) o

el test paramétrico Welch.

Finalmente, las comparaciones estadísticas de las proporciones de los dos tipos sinápticos (AS y SS), así como las proporciones de ambos tipos sinápticos en relación a su morfología y diana postsináptica se realizaron mediante tablas de contingencia que fueron analizadas con el test chi-cuadrado (χ^2).

Los análisis estadísticos se realizaron con la ayuda de GraphPad Prism (Prism 5.00, GraphPad Software Inc., EEUU) y SPSS (IBM SPSS Statistics v22, IBM Corp., EEUU), y el paquete Spatstat del programa R.

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

1.1. Análisis histopatológico y grosor cortical

La delimitación de la CTE y la CE se realizó en base a estudios previos y mediante la combinación de los marcadores Nissl, anti-NeuN, anti-PHF-Tau y anti-A β . La principal característica citoarquitectónica que permite la distinción e identificación de la CTE es que las capas III y V se fusionan y descenden oblicuamente hasta la capa II (Pre- α) de la CE. En el caso de la CE, la principal característica citoarquitectónica que permite su distinción e identificación es que la capa II (Pre- α) está formada por grandes islas de neuronas piramidales modificadas y células estrelladas (Figuras 3, 4 y 5; Braak y Braak, 1985; 1992; Braak *et al.*, 1996; Ding y Van Hoesen, 2010; Insauti y Amaral, 2012; Taylor y Probst, 2008).

Sobre las mismas secciones, se realizó una evaluación histopatológica que reveló en los casos de EA una aparente reducción de todas las estructuras del lóbulo LTM (Figura 3). Además, las tinciones frente a PHF-Tau y péptido A β revelaron la presencia de una cantidad variable de neuronas PHF-Tau inmunoreactivas y la presencia de placas de péptido A β en los casos con EA (Figura 3E-H, Tabla 3). En los casos control, no se encontraron placas de péptido A β , y solamente se encontraron en algunos casos y, de forma ocasional y aislada, neuronas PHF-Tau inmunoreactivas (Figura 3A-D; Tabla 3).

Para evaluar el grado de reducción de ambas cortezas en los casos de los pacientes con EA, se comparó el grosor de la CTE y la CE obtenido en secciones semifinas, tanto de sujetos control como de sujetos con EA.

El grosor medio de la CTE en los sujetos control fue de 2.7mm, mientras que en los pacientes con EA el grosor medio de la CTE fue de 1.7mm (Tabla 4; Tablas suplementarias 1, 2 y 3). Estos resultados revelaron una reducción significativa del grosor de la CTE (de aproximadamente un 35%) en los casos con EA, comparados con los sujetos control (t-test, $p=0.005$). En el caso de la CE, el grosor medio en el grupo control fue de 2.0mm y de 1.6mm en el grupo de pacientes con EA, observándose en este caso una reducción del grosor de la CE de aproximadamente un 20% en los pacientes con EA. Aunque se observó una reducción en el grosor cortical de la CE del grupo con EA esta reducción no fue estadísticamente significativa (t-test, $p=0.200$).

1.2. Fracción de volumen de los elementos corticales

El análisis de la V_v ocupada por somas neuronales, somas gliales, vasos sanguíneos y neuropilo estimado en secciones semifinas mostró que, en los casos control de la capa II de la CTE, los valores fueron de 7.2%, 0.5%, 3.3% y 89.0%, respectivamente. En el caso de los pacientes con EA, estos valores fueron 5.9%, 0.3%, 3.7% y 90.1%, respectivamente. Aunque la fracción de volumen ocupada por somas neuronales y gliales fue menor en el caso del grupo con EA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en relación a la V_v ocupada por los diferentes elementos analizados (t-test, $p > 0.05$; Figura 24; Tabla 4; Tabla suplementaria 1). En la capa II de la CE, la V_v ocupada por somas neuronales, somas gliales, vasos sanguíneos

Región	Grupo	V _{neu} (%; media± SD)	V _g (%; media± SD)	V _{vs} (%; media± SD)	V _n (%; media± SD)	Grosor (mm; media± SD)
Capa II CTE	Control	7.17±0.98	0.50±0.14	3.28±0.41	89.05±1.22	2.66±0.37
	Alzheimer	5.86±0.84	0.35±0.12	3.71±0.48	90.08±1.22	1.74±0.39
Capa II CE	Control	4.49±2.91	2.64±1.05	3.80±2.31	89.07±3.67	2.00±0.17
	Alzheimer	2.61±1.41	4.59±0.90	2.34±1.59	90.47±2.03	1.60±0.49
Capa III CE	Control	7.53±1.78	2.52±0.42	3.80±0.74	86.15±1.23	2.00±0.17
	Alzheimer	2.88±1.48	4.55±1.85	3.98±2.73	88.59±3.94	1.60±0.49

Tabla 4. Fracción de volumen ocupada por los elementos corticales de la capa II de la CTE y las capas II y III de la CE, y grosor cortical, en el grupo control y en el grupo con EA. V_{neu}: fracción de volumen ocupado por neuronas; V_g: fracción de volumen ocupado por glia; V_{vs}: fracción de volumen ocupado por vasos sanguíneos; V_n: fracción de volumen ocupado por neuropilo. Los datos por casos individuales están recogidos en las tablas suplementarias 1, 2 y 3.

y neuropilo estimada en el grupo control fue de 4.5%, 2.6%, 3.8% y 89.1%, respectivamente. En el caso del grupo de pacientes con EA dichos valores fueron 2.6%, 4.6%, 2.3% y 90.5%. A pesar de que en el grupo de pacientes con EA se encontró una disminución en el volumen cortical ocupado por neuronas, solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje ocupado por células gliales (t-test, $p=0.03$), siendo este superior en el caso del grupo de pacientes con EA (Figura 24; Tabla 4; Tabla suplementaria 2). En el caso de la capa III de la CE del grupo control, las V_v de los somas neuronales, somas gliales, vasos sanguíneos y neuropilo fueron: 7.5 %, 2.5%, 3.8% y 86.2 %, respectivamente. Dichos valores, fueron en el caso del grupo de pacientes con EA de 2.9%, 4.5%, 4.0% y 88.6%. Cuando se compararon los resultados de la capa III de la CE entre ambos grupos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcenta-

je de neuronas (t-test, $p=0.007$), siendo este menor en el caso del grupo de pacientes con EA (Figura 24; Tabla 4; Tabla suplementaria 3).

2. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL NEUROILO

2.1. Densidad sináptica

Los valores de densidad sináptica se obtuvieron dividiendo el número total de sinapsis incluidas dentro del marco de inclusión estereológico entre el volumen total de dicho marco. Los valores medios de cada grupo de estudio por capa y región se corresponden con la media de la densidad media de los sujetos en cada grupo (Tabla 5).

2.1.1. Capa II de la CTE

En las muestras de la capa II de la CTE se identificaron y reconstruyeron en 3D un

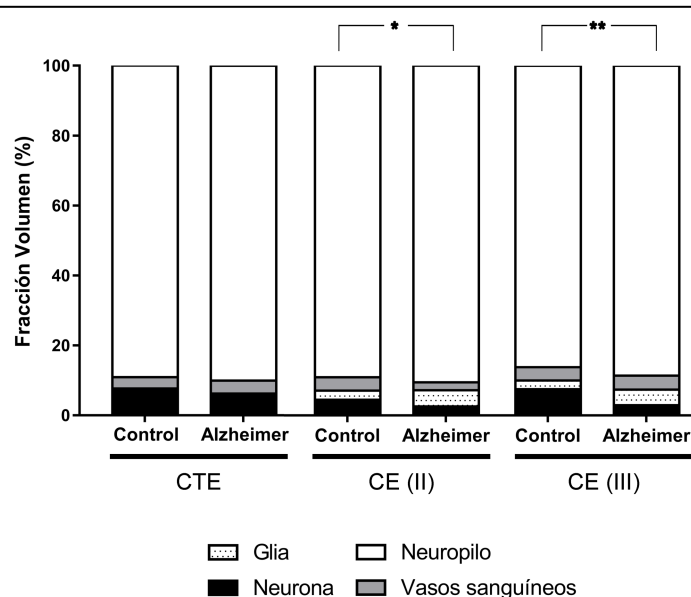


Figura 24. Gráficos de la fracción de volumen ocupada por los elementos corticales en la capa II de la CTE y en las capas II y III de la CE, en el grupo control y en el grupo con EA. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la V_{glia} en la capa II de la CE ($p=0.03$) y en la V_{neu} en la capa III de la CE ($p=0.007$), siendo estas mayores y menores, respectivamente, en el grupo con EA. V_{glia} : fracción de volumen ocupado por glia; V_{neu} : fracción de volumen ocupado por neuronas. El asterisco indica las diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

total de 6102 sinapsis. De ese total, se analizaron 4646 sinapsis, después de descartar aquellas sinapsis incompletas o que estaban tocando los bordes de exclusión del marco estereológico. De las 4646 sinapsis, 2656 fueron de las muestras de los casos control y 1990 de las muestras de los sujetos con EA. En el caso de los sujetos control, se analizó un volumen de inclusión total de $5295\mu m^3$, mientras que en el caso de los sujetos con EA el volumen de inclusión total analizado fue de $5266\mu m^3$ (Tabla 5; Tabla suplementaria 4).

La densidad sináptica media de la capa II de la CTE en el grupo control fue de 0.51 sinapsis/ μm^3 (con un rango de 0.41–0.75 sinapsis/ μm^3); mientras que en el caso del grupo de pacientes con EA la densidad sináptica media fue de 0.37 sinapsis/ μm^3 (con un rango de 0.16–0.49 sinapsis/ μm^3 ; Figura 25; Tabla 5; Tabla suplementaria 4). Aunque la densidad sináptica media fue menor en el grupo de pacientes con EA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (MW, $p=0.22$; Figura 25).

2.1.2. Capa II de la CE

En el caso de las muestras de la capa II de la CE, se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 3694 sinapsis, de las cuales se analizaron 2734 sinapsis, después de descartar aquellas sinapsis incompletas o que estaban tocando los bordes de exclusión del marco estereológico. De las 2734 sinapsis, 1690 fueron de las muestras de los casos control y 1044 de las muestras de los sujetos con EA. En el caso de los sujetos control, se analizó un volumen de inclusión total de $4221\mu m^3$; mientras que en el caso de los sujetos con EA el volumen total analizado fue de $4409\mu m^3$ (Tabla 5; Tabla suplementaria 5).

La densidad sináptica media de la capa II de la CE en el grupo control fue de 0.40 sinapsis/ μm^3 (con un rango de 0.38–0.43 sinapsis/ μm^3); mientras que en el caso del grupo de pacientes con EA la densidad sináptica media fue de 0.24 sinapsis/ μm^3 (con un rango de 0.12–0.32 sinapsis/ μm^3 ; Figura 25; Tabla 5; Tabla suplementaria 5). Cuando se compararon ambas densidades medias en-

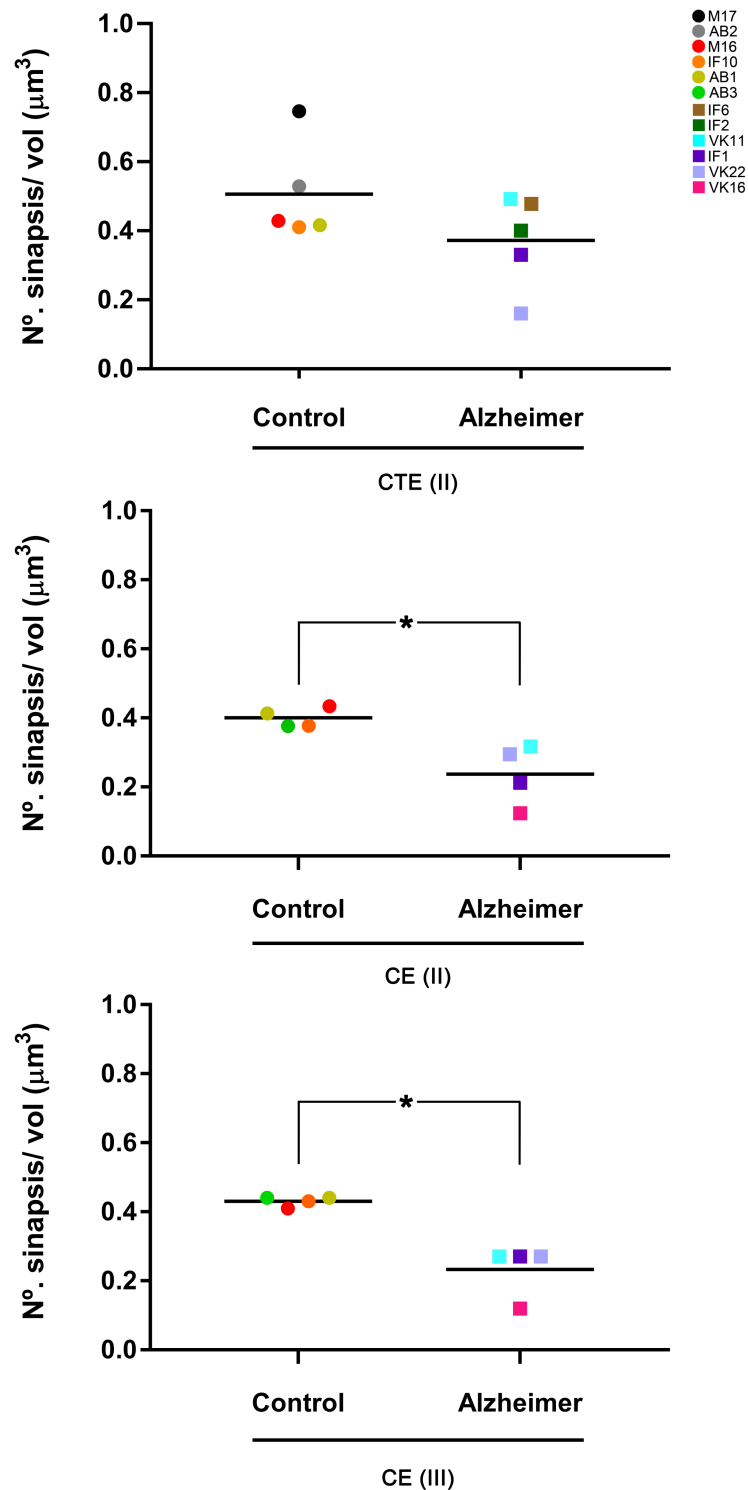


Figura 25. Gráficos de las densidades sinápticas medias de la capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE, en el grupo control y en el grupo con EA. Los sujetos control están representados por círculos y los sujetos con EA por cuadrados. Cada color se corresponde a un sujeto analizado en el estudio, tal y como se muestra en la leyenda de la esquina superior derecha. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la densidad sináptica media de la capa II de la CTE entre el grupo control y el grupo con EA ($p=0.22$). En las capas II y III de la CE si se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo con EA en la densidad sináptica media, siendo esta menor en el caso del grupo con EA ($p=0.03$). El asterisco indica las diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Región	Grupo	Nº SA	Nº SS	Nº total sinapsis	% SA (media±SD)	% SS (media±SD)	Marco inclusión (µm³)	Nº SA /µm³ (media±SD)	Nº SS /µm³ (media±SD)	Nº total sinapsis/µm³ (media±SD)	V _m (%; media±SD)	Distancia al vecino más cercano (nm; media±SD)
Capa II	Control	2545	111	2656	95.64±1.24	4.36±1.24	5295	0.49±0.14	0.02±0.01	0.51±0.14	6.66±1.19	791.54±74.47
	Alzheimer	1887	103	1990	94.47±0.72	5.53±0.72	5266	0.35±0.13	0.02±0.01	0.37±0.14	6.28±0.72	881.50±129.37
Capa II	Control	1553	137	1690	91.90±2.62	8.10±2.62	4221	0.37±0.05	0.03±0.01	0.40±0.03	5.37±0.92	811.30±33.49
	Alzheimer	954	90	1044	90.53±4.27	9.47±4.27	4409	0.21±0.09	0.02±0.01	0.24±0.09	4.63±0.98	906.30±108.80
Capa III	Control	1747	130	1877	92.84±1.97	7.16±1.978	4371	0.40±0.09	0.03±0.01	0.43±0.01	5.77±0.44	822.70±41.02
	Alzheimer	973	92	1065	92.12±5.70	7.88±5.70	4597	0.22±0.06	0.02±0.02	0.24±0.08	4.83±1.12	970.00±206.50

Tabla 5. Datos acumulados obtenidos del análisis de la ultraestructura del neuropilo de la capa II de la CTE y las capas II y III de la CE, en el grupo control y en el grupo con EA. Todos los datos están corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. V_m: fracción de volumen mitocondrial. Los datos por casos individuales están recogidos en las tablas suplementarias 4, 5 y 6.

tre grupos, se encontró que la densidad sináptica media de la capa II de la CE fue significativamente menor en el grupo con EA (t-test, $p=0.03$; Figura 25).

2.1.3. Capa III de la CE

En las muestras de la capa III de la CE, se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 4048 sinapsis, de las cuales se analizaron 2942 sinapsis tras descartar aquellas sinapsis incompletas o que estaban tocando los bordes de exclusión del marco estereológico. De las 2942 sinapsis, 1877 fueron de las muestras de los casos control y 1065 de las muestras de los sujetos con EA. En el caso de los sujetos control, se analizó un volumen de inclusión total de $4371\mu\text{m}^3$; mientras que en el caso de los sujetos con EA el volumen total analizado fue de $4597\mu\text{m}^3$ (Tabla 5; Tabla suplementaria 6).

La densidad sináptica media de la capa III de la CE en el grupo control fue de 0.43 sinapsis/ μm^3 (con un rango de 0.41–0.44 sinapsis/ μm^3); mientras que en el caso del grupo de pacientes con EA la densidad sináptica media fue de 0.24 sinapsis/ μm^3 (con un rango de 0.12–0.27 sinapsis/ μm^3 ; Figura 25; Tabla 5; Tabla suplementaria 6). Al comparar las densidades medias entre grupos, se encontró que la densidad sináptica media de la capa III de la CE fue significativamente menor en el grupo con EA (MW, $p=0.03$; Figura 25).

2.2. Proporción de sinapsis excitadoras e inhibitoras

Puesto que cada una de las sinapsis pudo ser reconstruida en 3D, se pudo diferenciar

con precisión entre sinapsis excitadoras o asimétricas (con una PSD prominente) y sinapsis inhibitoras o simétricas (con una PSD delgada).

En la capa II de la CTE, la proporción de SA y SS en el grupo control fue de 96% y 4%, respectivamente. En el caso de los sujetos con EA, la proporción sináptica fue de 95% SA y 5% SS (Tabla 5; Tabla suplementaria 4). En la capa II de la CE, la proporción de SA y SS en el grupo control fue de 92% y 8%, respectivamente; mientras que en el grupo de pacientes con EA la proporción de SA fue de 91% y la proporción de SS fue de 9% (Tabla 5; Tabla suplementaria 5). En la capa III de la CE, se observó en el grupo control una proporción de sinapsis de 93% de SA y 7% de SS; encontrándose la misma proporción en el caso del grupo de sujetos con EA (92% SA; 8% SS; Tabla 5; Tabla suplementaria 6). Cuando se compararon las proporciones de ambos tipos de sinapsis (SA y SS) entre grupos, en ninguna de las capas se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de SA y SS entre el grupo control y el grupo con EA (χ^2 , $p>0.05$).

2.3. Distribución sináptica espacial tridimensional

Para analizar la distribución espacial de las sinapsis, se comparó la posición real de cada una de las sinapsis en cada una de las series de imágenes con un modelo de distribución espacial aleatoria CSR. Para ello, se calcularon las funciones G, K y F, típicas de estadística espacial. En todos los stacks de imágenes analizados (30 de la capa II de la CTE, 24 de la capa II de la CE y 24 de la capa

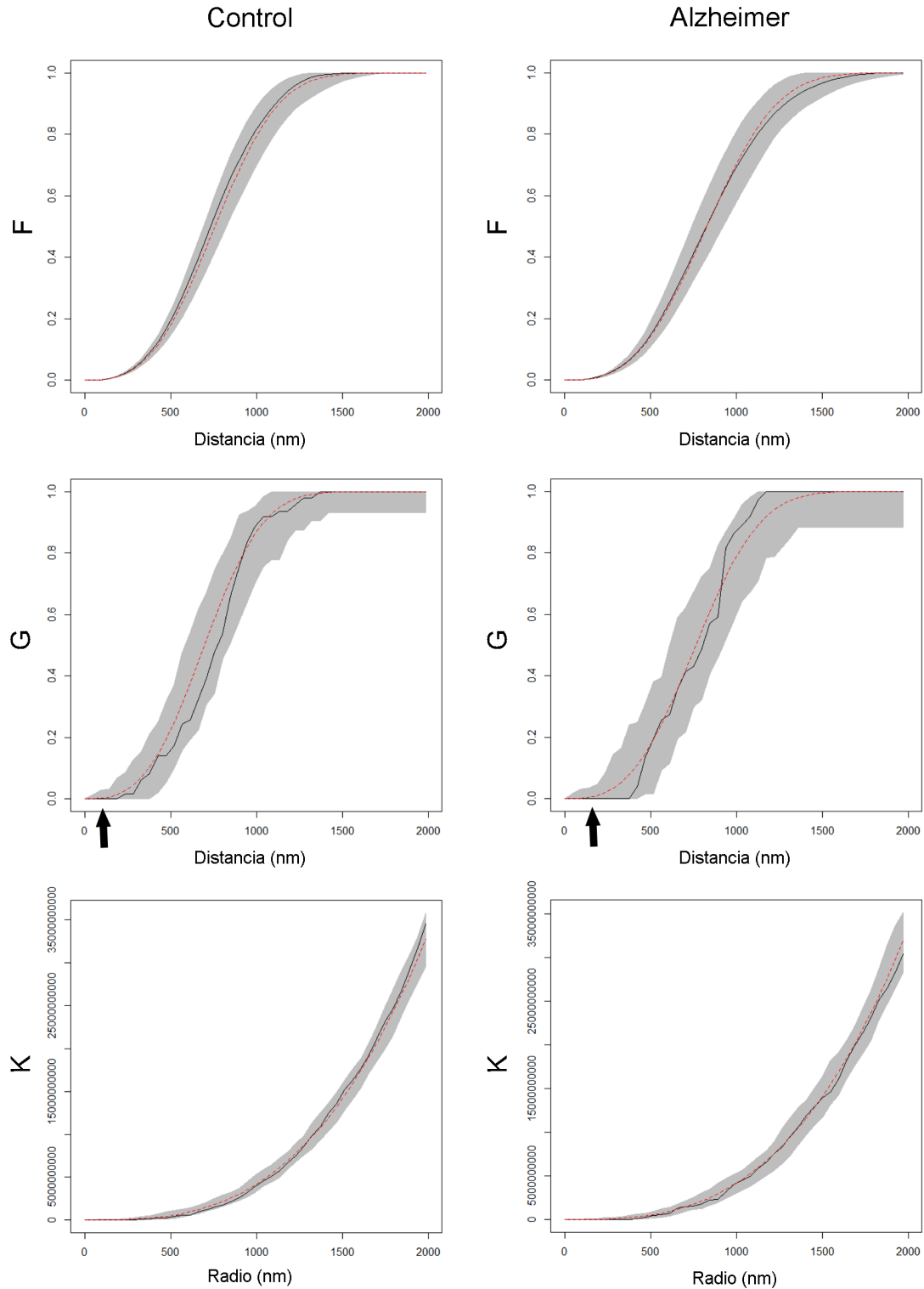


Figura 26. Análisis de la distribución espacial sináptica 3D de un sujeto control y un sujeto con EA en la capa II de la CTE. La línea roja punteada se corresponde con el modelo teórico de Poisson esperado para cada una de las funciones (F, G y K). La línea continua negra se corresponde con la función observada en la muestra. La zona gris representa el área de inclusión calculada con 99 simulaciones. Todos los gráficos muestran una distribución espacial observada que encaja con la función de Poisson teórica. En la función G, las flechas muestran un espacio vacío que se debe a que las sinapsis no pueden solaparse en el espacio y, por tanto, tienen una distancia mínima entre ellas. F: función F; G: función G; K: función K.

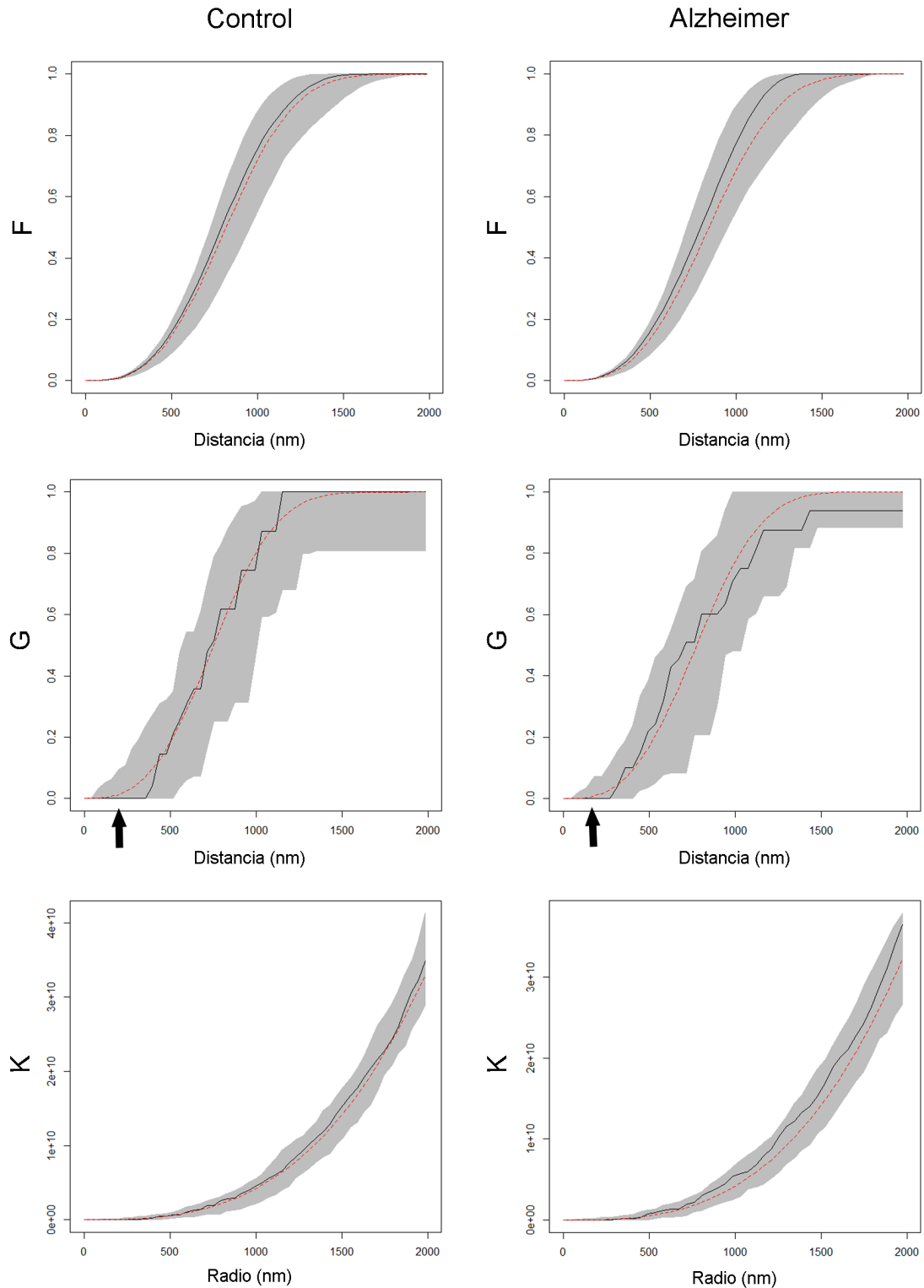


Figura 27. Análisis de la distribución espacial sináptica 3D de un sujeto control y un sujeto con EA en la capa II de la CE. La línea roja punteada se corresponde con el modelo teórico de Poisson esperado para cada una de las funciones (F, G y K). La línea continua negra se corresponde con la función observada en la muestra. La zona gris representa el área de inclusión calculada con 99 simulaciones. Todos los gráficos muestran una distribución espacial observada que encaja con la función de Poisson teórica. En la función G, las flechas muestran un espacio vacío que se debe a que las sinapsis no pueden solaparse en el espacio y, por tanto, tienen una distancia mínima entre ellas. F: función F; G: función G; K: función K.

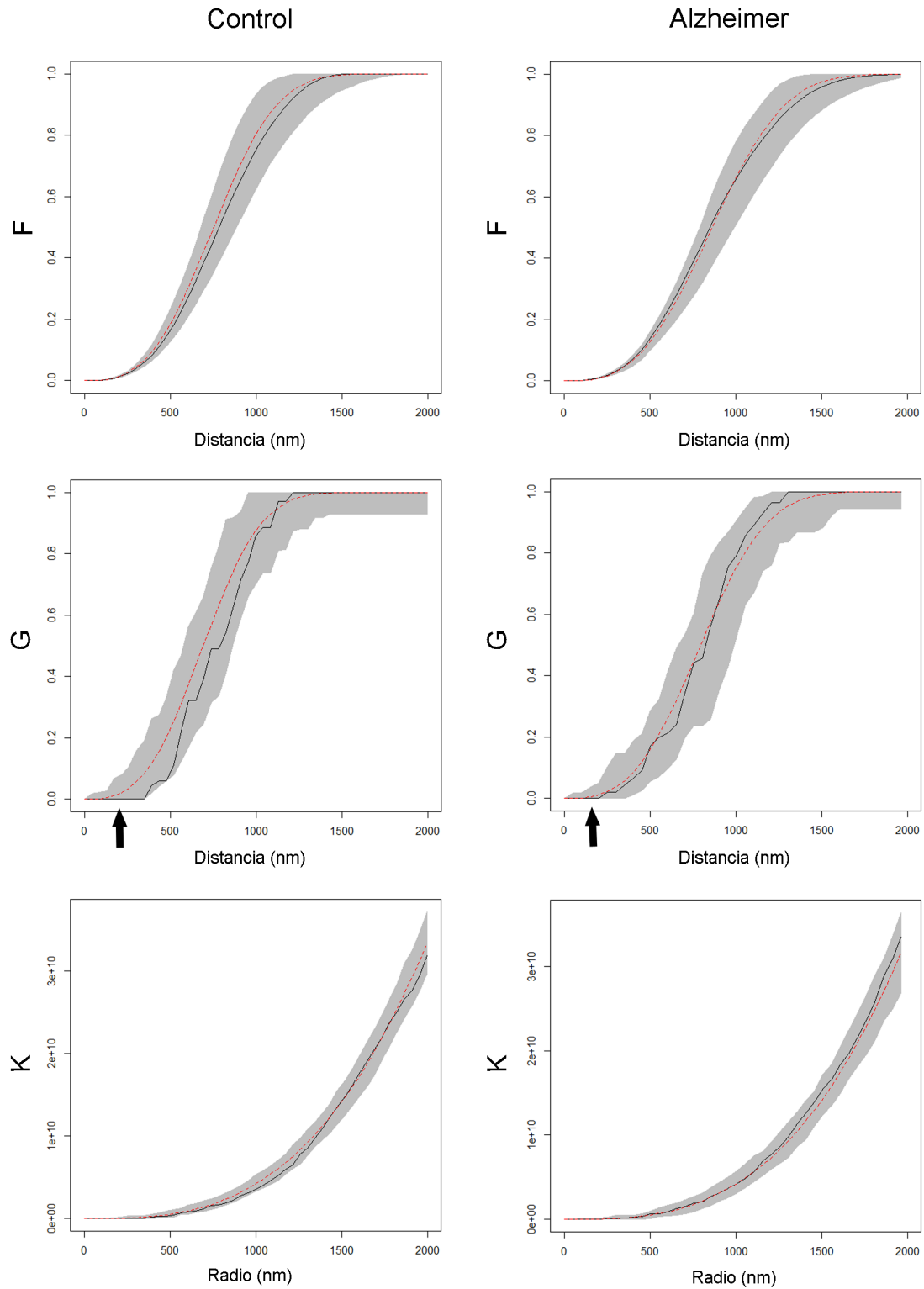


Figura 28. Análisis de la distribución espacial sináptica 3D de un sujeto control y un sujeto con EA en la capa III de la CE. La línea roja punteada se corresponde con el modelo teórico de Poisson esperado para cada una de las funciones (F, G y K). La línea continua negra se corresponde con la función observada en la muestra. La zona gris representa el área de inclusión calculada con 99 simulaciones. Todos los gráficos muestran una distribución espacial observada que encaja con la función de Poisson teórica. En la función G, las flechas muestran un espacio vacío que se debe a que las sinapsis no pueden solaparse en el espacio y, por tanto, tienen una distancia mínima entre ellas. F: función F; G: función G; K: función K.

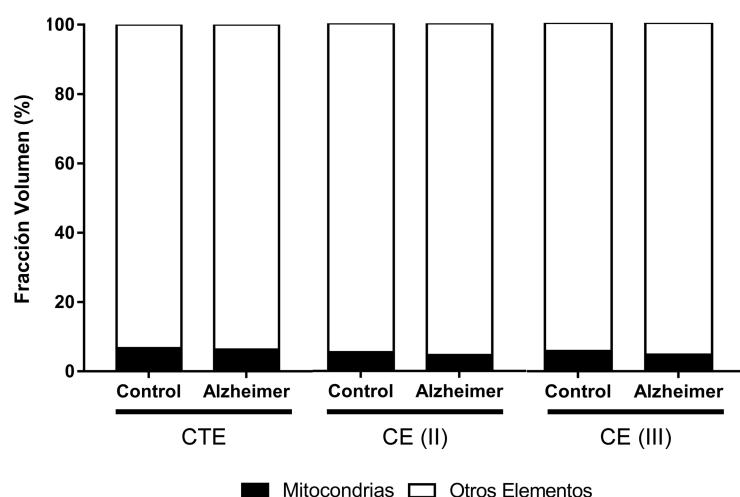


Figura 29. Gráficos de la fracción de volumen de neuropilo ocupada por las mitocondrias en la capa II de la CTE y en las capas II y III de la CE, en el grupo control y en el grupo con EA. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en ninguna de las regiones analizadas.

III de la CE), las tres funciones de estadística espacial se asemejaban a la curva teórica que simula el patrón de distribución espacial aleatorio, lo que indicó que las sinapsis encajaban con un modelo de distribución espacial aleatorio, tanto en el grupo control como en el grupo con EA, en ambas regiones (Figuras 26, 27 y 28).

Además, se calculó en cada una de las series de imágenes la distancia de cada sinapsis a su sinapsis más cercana (distancia al vecino más cercano). En la capa II de la CTE, la distancia media al vecino más cercano fue de 791.5nm en el caso del grupo control; mientras que en el grupo con EA, la media de la distancia al vecino más cercano fue de 881.5nm (Tabla 5; Tabla suplementaria 4). En la capa II de la CE, en el grupo control, la distancia media al vecino más cercano fue de 811.3nm, siendo esta distancia de 906.3nm en el grupo con EA (Tabla 5; Tabla suplementaria 5). En la capa III de la CTE, la media de la distancia al vecino más cercano fue de 822.7nm en el caso del grupo control; mientras que en el grupo con EA, la media de la distancia al vecino más cercano fue de 970.0nm (Tabla 5; Tabla suplementaria 6). Aunque en ambas regiones la distancia media de cada sinapsis a su ve-

cino más cercano fue mayor en el caso del grupo con EA, en ninguna de las capas analizadas se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo con EA (MW, t-test, $p > 0.05$).

2.4. Fracción de volumen mitocondrial

La fracción de volumen mitocondrial estimada en fotografías de microscopia electrónica de todos los sujetos mostró que, en la capa II de la CTE, el porcentaje de volumen de neuropilo ocupado por mitocondrias fue de 6.7%, mientras que en el caso del grupo con EA dicho porcentaje fue del 6.3%. En el grupo control de la capa II de la CE, un 5.4% del volumen de neuropilo estaba ocupado por mitocondrias; siendo este porcentaje un 4.6% en el grupo con EA. En la capa III de la CE, dichos porcentajes fueron de 5.8% en el grupo control y de 4.8% en el grupo con EA. En ninguna de las tres capas se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la fracción de volumen del neuropilo ocupado por mitocondrias entre el grupo control y el grupo con EA (t-test, $p > 0.05$; Figura 29; Tabla 5; Tablas suplementarias 4, 5 y 6).

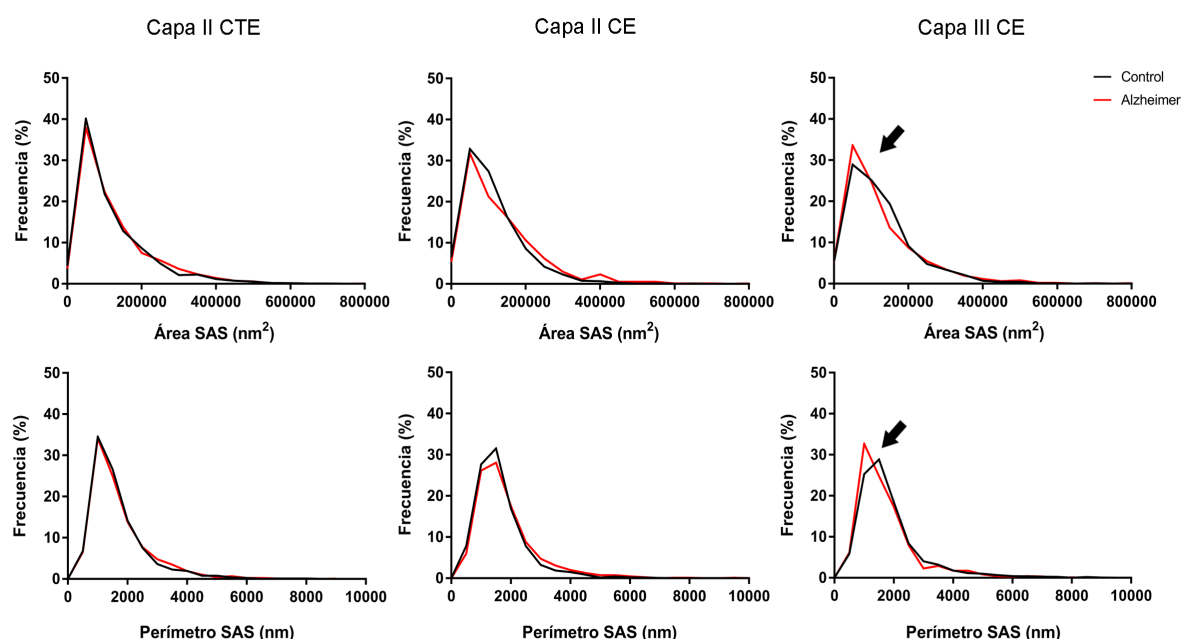


Figura 30. Gráficos de la distribución de frecuencias del área y perímetro de la SAS de las SA en la capa II de la CTE y en las capas II y III de la CE. El grupo control está representado en negro y el grupo con EA en rojo. Las flechas señalan aquellos casos en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distribuciones de frecuencia de ambos grupos (KS, $p < 0.0001$).

3. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS SINAPSIS

3.1. Tamaño sináptico: superficie sináptica de aposición

El estudio del tamaño sináptico se realizó mediante el análisis de las características del área y el perímetro de la SAS de cada una de las sinapsis identificadas y reconstruidas en 3D en todas las muestras.

3.1.1. Capa II de la CTE

En la capa II de la CTE, el tamaño medio (medido por el área de la SAS) de las SA fue de 118037 nm^2 en el grupo control y 125998 nm^2 en el grupo con EA (Tabla 6; Tabla suplementaria 7). En el caso de las SS, el tamaño medio en el grupo control fue de

73590 nm^2 ; mientras que en el grupo con EA el tamaño medio de las SS fue de 66750 nm^2 (Tabla 6; Tabla suplementaria 7).

Al comparar el tamaño medio de las sinapsis en el grupo control, se encontró que el área y el perímetro medio de la SAS de las SA fue significativamente mayor que el área media de la SAS de las SS (t-test, $p < 0.05$). Además, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de frecuencias del área de la SAS de las SA y las SS (KS, $p < 0.0001$), indicando ambos resultados que las SA son más grandes que las SS.

Cuando se compararon los tamaños sinápticos entre el grupo control y el grupo con EA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en la media del área o perímetro (t-test, $p > 0.05$) ni en las distribuciones de frecuencias de dichos parámetros (KS, $p > 0.0001$), tanto para el caso

Región	Grupo	Tipo de sinapsis	Área SAS (nm ² ; media± sem)	Perímetro SAS (nm; media± sem)
Capa II CTE	Control	SA	118037±9102	1647±64
		SS	73590±6592	1415±31
	Alzheimer	SA	125998±4681	1690±23
		SS	66750±7122	1272±72
Capa II CE	Control	SA	110311±3229	1631±48
		SS	65997±6041	1404±74
	Alzheimer	SA	136166±10773	1819±52
		SS	59232±6589	1239±72
Capa III CE	Control	SA	124183±3265	1826±67
		SS	67445±3243	1399±75
	Alzheimer	SA	122727±10453	1720±116
		SS	57271±14132	1343±272

Tabla 6. Área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y la SS de capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE, en el grupo control y en el grupo con EA. Todos los datos están corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos por casos individuales están recogidos en las tablas suplementarias 7, 8 y 9.

de SA como de SS (Figura 30). Esto podría indicar que no se están produciendo cambios en el tamaño sináptico en las muestras de los pacientes con EA en la capa II de la CTE.

3.1.2. Capa II de la CE

En la capa II de la CE el tamaño medio (medido por el área de la SAS) de las SA del grupo control fue de 110311nm²; mientras que en el grupo con EA fue de 136166nm² (Tabla 6; Tabla suplementaria 8). En relación a las SS, su tamaño medio en el caso del grupo control fue de 65997nm², siendo

este 59232nm² en el grupo con EA (Tabla 6; Tabla suplementaria 8).

Cuando se comparó el tamaño medio de los dos tipos de sinapsis en el grupo control, se encontró que tanto el área como el perímetro medio de la SAS de las SA era significativamente mayor que el área y el perímetro medio de la SAS de las SS (t-test, $p=0.002$). Esta diferencia se encontró también en la distribución de frecuencias del área y perímetro de ambos tipos sinápticos (KS, $p<0.0001$), indicando que las SA fueron más grandes que las SS. Cuando se compararon los tamaños sinápticos medios de las SA y las SS entre el grupo control y el grupo con

EA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medias del área de las SAS, tanto para el caso de las SA como de las SS (t-test, $p > 0.05$); encontrándose solo diferencia en el perímetro medio de las SA entre ambos grupos (t-test, $p = 0.04$; Tabla 6; Tabla suplementaria 8). No se encontraron diferencias en las distribuciones de frecuencias ni del área ni del perímetro de las SA y SS entre grupos (KS, $p > 0.0001$; Figura 30).

3.1.3. Capa III de la CE

En la capa III de la CE el tamaño medio del área de las SA fue de 124183nm^2 en el grupo control y de 122727nm^2 en el grupo de sujetos con EA. En el caso de las SS, el tamaño medio en el grupo control fue 67445nm^2 , siendo el tamaño medio de las SS en el grupo de sujetos con EA de 57271nm^2 (Tabla 6; Tabla suplementaria 9). Al comparar el tamaño medio de los dos tipos de sinapsis en el grupo control, se encontró que tanto el área como el perímetro medio de la SAS de las SA fueron significativamente mayores que los mismos parámetros en el caso de las SS (t-test, $p < 0.05$). Dichas diferencias se encontraron también en las distribuciones de frecuencias del área y el perímetro de ambos tipos sinápticos (KS, $p < 0.0001$), indicando, de nuevo, que las SA eran más grandes que las SS. Cuando se compararon los tamaños sinápticos medios de las SA y las SS entre el grupo control y el grupo con EA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medias del área o perímetro de las SAS, tanto para el caso de las SA como de las SS (t-test, $p > 0.05$; Tabla 6; Tabla suplementaria 9). Sin embargo, sí que se encontraron diferencias

estadísticamente significativas en las distribuciones de frecuencia del área y perímetro de las SA entre el grupo control y el grupo con EA (KS, $p < 0.0001$; Figura 30). Lo que sugiere que los casos con EA presentaban una mayor proporción de SA de dimensiones relativamente más pequeñas.

3.2. Morfología sináptica: forma de las sinapsis

En relación a su forma, las sinapsis fueron clasificadas en cuatro tipos: macular (PSD continua en forma de disco), perforada (PSD con una o varias perforaciones), herradura (PSD con hendidura) o fragmentada (dos o más PSDs diferenciadas; Domínguez-Álvaro *et al.*, 2019; Santuy *et al.*, 2018a; Figura 10).

3.2.1. Capa II de la CTE

En el grupo control de la capa II de la CTE, se identificaron y reconstruyeron en 3D 2561 SA. De esas sinapsis, la mayoría presentaron una morfología macular (83.8%), seguidas de una morfología perforada (11.8%), en herradura (3.8%) y fragmentada (0.6%; Tabla 7; Tabla suplementaria 10). En relación a las SS, se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 127 sinapsis. La mayoría de ellas presentaron una forma macular (83.5%) y en herradura (12.6%). Las sinapsis menos frecuentes fueron las SS perforadas (3.9%), y no se encontraron SS fragmentadas (Tabla 7; Tabla suplementaria 10).

Teniendo en cuenta la categoría de morfología sináptica, se encontró que el 95.3% de las sinapsis maculares fueron SA, mientras que el 4.7% restante eran SS. Esta propor-

Región	Grupo	Tipo de sinapsis	Macular	Perforada	Herradura	Fragmentada	Nº Total sinapsis
Capa II CTE	Control	SA	83.8% (2145)	11.8% (302)	3.8% (98)	0.6% (16)	100% (2561)
		SS	83.5% (106)	3.9% (5)	12.6% (16)	0.0% (0)	100% (127)
	Alzheimer	SA	81.4% (1558)	11.5% (221)	5.3% (101)	1.8% (35)	100% (1915)
		SS	92.5% (110)	6.7% (8)	0.8% (1)	0.0% (0)	100% (119)
Capa II CE	Control	SA	83.0% (1285)	12.9% (200)	3.3% (51)	0.8% (13)	100% (1549)
		SS	73.0% (100)	11.0% (15)	15.3% (21)	0.7% (1)	100% (137)
	Alzheimer	SA	80.6% (769)	13.4% (128)	4.9% (47)	1.1% (10)	100% (954)
		SS	73.4% (66)	12.2% (11)	12.2% (11)	2.2% (2)	100% (90)
Capa III CE	Control	SA	75.9% (1326)	19.9% (347)	3.3% (58)	0.9% (15)	100% (1746)
		SS	65.9% (85)	15.5% (20)	17.0% (22)	1.6% (2)	100% (129)
	Alzheimer	SA	82.8% (806)	10.2% (99)	4.3% (42)	2.7% (26)	100% (973)
		SS	73.9% (68)	8.7% (8)	10.9% (10)	6.5% (6)	100% (92)

Tabla 7. Proporción de sinapsis maculares, perforadas, herradura y fragmentadas en la capa II de la CTE y en las capas II y III de la CE, en el grupo control y el grupo con EA. Entre paréntesis se muestran los valores absolutos. Los datos por casos individuales están recogidos en las tablas suplementarias 10, 11 y 12.

ción fue algo diferente en el caso de las sinapsis con morfología perforada, donde el 98.4% fueron SA y el 1.6% SS. Sin embargo, en el caso de las sinapsis en herradura, está proporción fue significativamente diferente, encontrándose que un 86% de las sinapsis

en herradura fueron SA, mientras que un 14.0% fueron SS (χ^2 , $p < 0.0001$). Esta diferencia podría indicar que las sinapsis en herradura son más frecuentes en la categoría de SS de lo que cabría esperar por azar. En el caso de las sinapsis fragmentadas, el

100% fueron SA (Figura 31A).

En las muestras de la capa II de la CTE del grupo con EA, se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 1915 SA, de las cuales, la mayoría presentaron una morfología macular (81.4%). El 11.5% de las SA presentaron una forma perforada, seguidas de un 5.3% con morfología en herradura y un 1.8% fragmentada (Tabla 7; Tabla suplementaria 10). En relación a las SS, se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 119 sinapsis. De esas 119, la mayoría tenían una forma macular (92.5%), seguidas de una morfología perforada (6.7%) y en herradura (0.8%). Igual que en el caso del grupo control, no se encontraron SS fragmentadas (Tabla 7; Tabla suplementaria 10).

Si se atiende de nuevo a la categoría morfológica, tal y como ocurre en el grupo control, el 93.4% de las sinapsis maculares fueron SA, frente al resto de sinapsis maculares (6.6%) que fueron SS. Esta proporción fue ligeramente diferente en el grupo de sinapsis perforadas, donde un 96.5% fueron SA y un 3.5% SS. En el caso de las sinapsis en herradura, un 99.0% fueron SA y un 1.0% SS. De nuevo, el 100% de las sinapsis fragmentadas fueron SA (Figura 31B).

Para evaluar posibles diferencias en la proporción de sinapsis entre el grupo control y el grupo con EA, se analizaron las tablas de contingencia para cada una de las categorías morfológicas. Los resultados mostraron que en el grupo con EA las SA fragmentadas fueron significativamente más frecuentes que en el grupo control (χ^2 , $p < 0.001$). Esta diferencia no se encontró en relación con las SA maculares, perforadas o en herradura, aunque sí que se observó un ligero aumento en el número de SA en herradura (χ^2 ,

$p = 0.02$) y una pequeña disminución en el número de SA maculares (χ^2 , $p = 0.04$; Figura 32A). Con relación a las SS, como el número de las mismas no fue suficiente como para realizar un análisis estadístico robusto diferenciando cada una de las cuatro categorías morfológicas, se establecieron solamente dos categorías morfológicas: sinapsis con morfología macular y sinapsis con morfología no macular (atendiendo a la mayor complejidad morfológica de las sinapsis perforadas, en herradura y fragmentadas). Igualmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de SS con morfología macular y morfología no macular entre el grupo control y el grupo con EA (χ^2 , $p > 0.001$).

3.2.2. Capa II de la CE

En el grupo control de la capa II de la CE, se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 1549 SA. De ese total, un 83.0% presentaron una morfología macular, seguidas de un 12.9% con morfología perforada, un 3.3% en herradura y un 0.8% fragmentada (Tabla 7; Tabla suplementaria 11). En cuanto a las SS, se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 137 sinapsis, de las cuales la mayoría presentó una morfología macular (73.0%). Del resto, un 15.3% fueron SS con forma en herradura, un 11.0% perforada y, finalmente, un 0.7% fragmentada (Tabla 7; Tabla suplementaria 11).

Atendiendo a la categoría morfológica, del total de sinapsis maculares del grupo control, un 92.8% fueron SA y un 7.2% SS. Esta proporción de mantuvo en el caso de las sinapsis perforadas (93.0% de SA y 7.0% de SS), mientras que cambió significativamente en el caso del total de las sinapsis en herra-

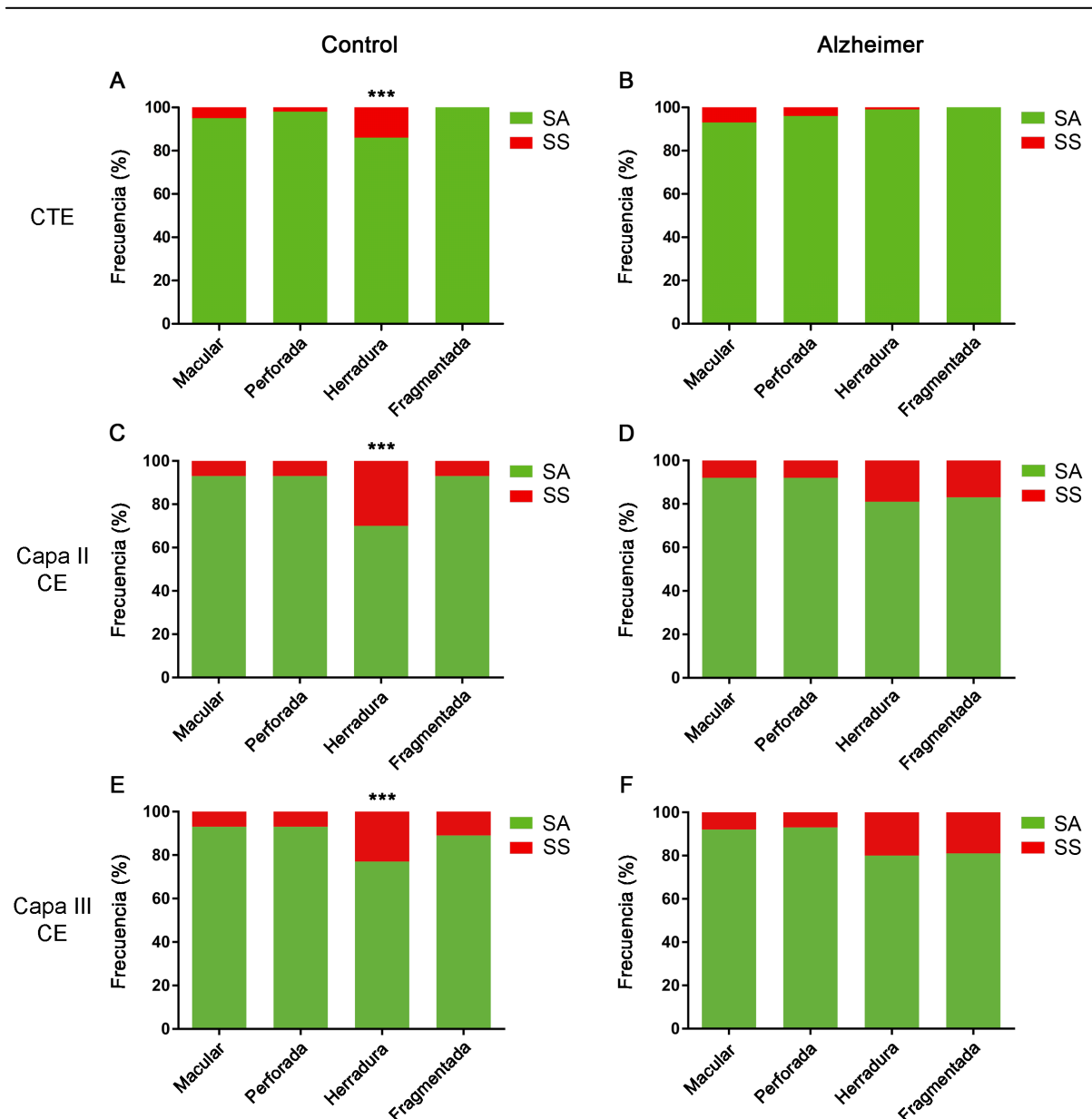


Figura 31. Gráficos de la proporción de SA y SS en función de la categoría morfológica en la capa II de la CTE (A y B) y en las capas II (C y D) y III (E y F) de la CE, tanto en el grupo control como en el grupo con EA. Las sinapsis en forma de herradura fueron significativamente más frecuentes en la categoría de SS que en la de SA (χ^2 , $p < 0.0001$).

dura, encontrándose que un 70.8% del total de las sinapsis con forma en herradura eran SA y un 29.2% SS (χ^2 , $p < 0.0001$), es decir que las sinapsis en herradura eran más frecuentes en la categoría de SS. Al igual que lo encontrado en el grupo control de la capa II de la CTE, las sinapsis en herradura fueron más frecuentes en la categoría de SS que en la de SA. En el caso de las sinapsis

fragmentadas, la proporción fue de nuevo un 92.9% de SA y un 7.1% de SS (Figura 31C).

En las muestras de la capa II de la CE del grupo con EA se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 954 SA, de las cuales, la mayoría (80.6%) fueron maculares. Del resto, un 13.4% fueron SA perforadas, un 4.9% SA con forma de herradura, y, fi-

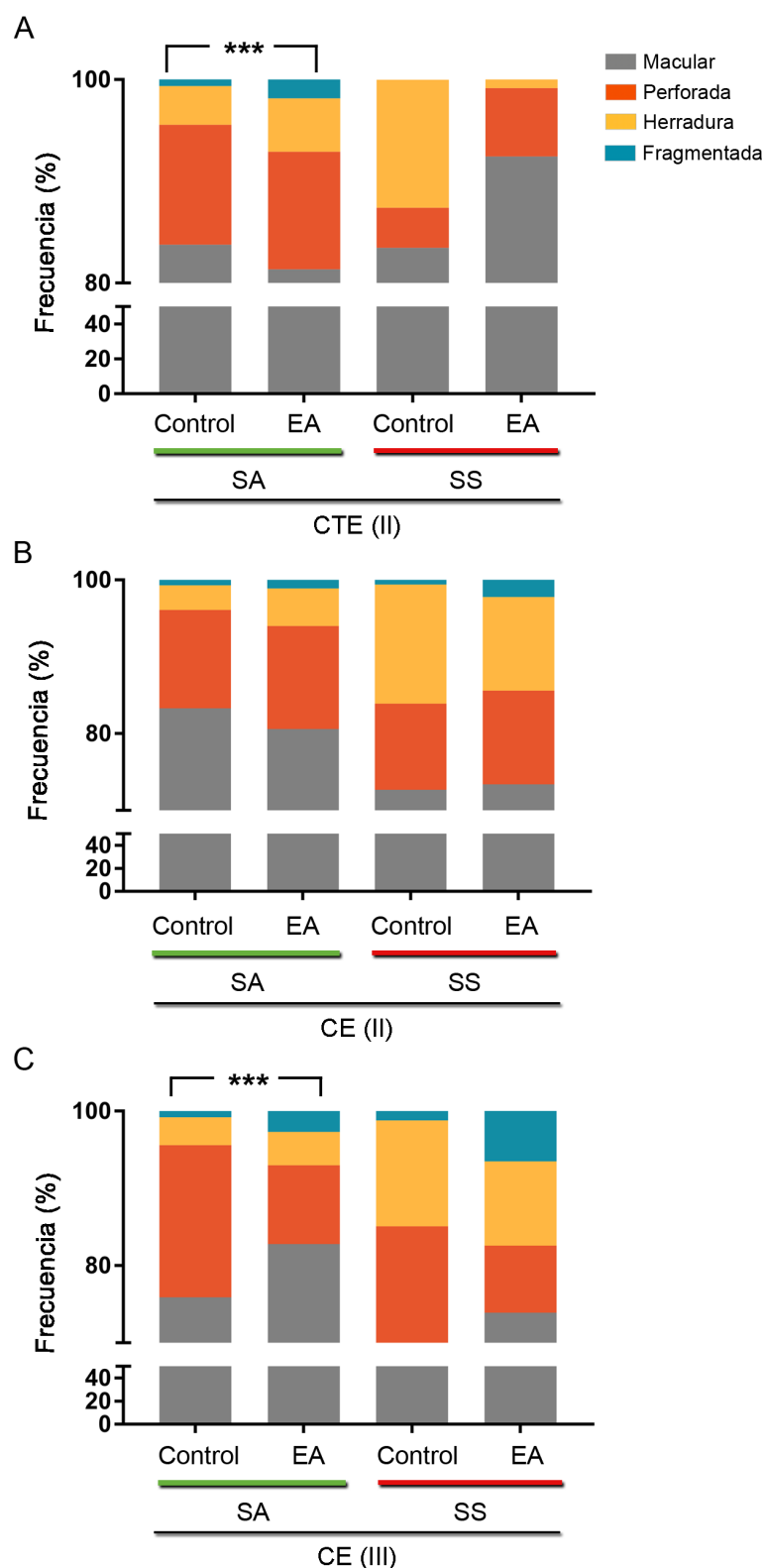


Figura 32. Proporción de SA y SS maculares, perforadas, herraduras y fragmentadas en el grupo control y en el grupo con EA de la capa II de la CTE (A) y de las capas II (B) y III (C) de la CE. En la capa II de la CTE, en el grupo de sujetos con EA las SA fragmentadas fueron significativamente más frecuentes que en el grupo control (χ^2 , $p < 0.001$). En la capa III de la CE, en el grupo de sujetos con EA las SA fragmentadas y maculares fueron significativamente más frecuentes que en el grupo control, encontrándose un menor número de SA perforadas (χ^2 , $p < 0.001$).

nalmente, un 1.1% fragmentadas (Tabla 7; Tabla suplementaria 11). En relación a las SS, se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 90 SS. De ese total, un 73.4% presentó morfología macular, un 12.2% perforada; seguido de un 12.2% de SS con morfología en herradura y un 2.2% fragmentada (Tabla 7; Tabla suplementaria 11). Si se diferencian por categoría morfológica, del total de sinapsis maculares del grupo con EA un 92.1% fueron SA, mientras que el 7.9% restante fueron SS. Esta proporción de mantuvo en el caso de las sinapsis con morfología perforada (92.1% de SA y 7.9% de SS), y fue ligeramente diferente en el caso de las sinapsis con morfología en herradura, donde un 81.0% fueron SA y un 19.0% SS. En el caso de las sinapsis fragmentadas, un 83.3% fueron SA y un 16.7% SS (Figura 31D).

Al evaluar las posibles diferencias en la proporción de los distintos tipos morfológicos entre el grupo control y el grupo con EA no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (χ^2 , $p>0.001$), aunque sí que se observó un ligero aumento del número de SA en forma de herradura en las muestras procedentes del grupo con EA (χ^2 , $p=0.04$; Figura 32B). En el caso de las SS, de nuevo, la muestra no fue lo suficientemente grande como para realizar un análisis estadístico robusto diferenciando cada una de las cuatro categorías morfológicas, por lo que solo se consideraron las dos categorías morfológicas de sinapsis con morfología macular y sinapsis con morfología no macular. Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de SS con morfología macular y no macular entre el

grupo control y el grupo con EA (χ^2 , $p>0.001$).

3.2.3. Capa III de la CE

En las muestras del grupo control de la capa III de la CE se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 1746 SA. De esas 1746, la mayoría presentaron una morfología macular (75.9%), seguida de perforada (19.9%) y herradura (3.3%). Un pequeño porcentaje de las SA presentó una morfología fragmentada (0.9%: Tabla 7; Tabla suplementaria 12). En el caso de las SS, se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 129 sinapsis, de las cuales un 65.9% presentaba una morfología macular. El 15.5% mostraba una forma perforada; el 17.0% en herradura, y, finalmente, el 1.6% tenía una morfología fragmentada (Tabla 7; Tabla suplementaria 12).

Si se diferencia por categoría morfológica, en el caso del grupo control, un 94.0% de las sinapsis de morfología macular fueron SA, mientras que el 6.0% fueron SS. Esta proporción se mantuvo en el caso de las sinapsis perforadas (un 94.5% fueron SA y un 5.5% fueron SS), sin embargo, cambió significativamente en el caso de las sinapsis con forma en herradura, donde un 72.5% fueron SA y un 27.5% SS (χ^2 , $p<0.0001$). De nuevo, al igual que ocurría en la capa II de la CTE y en la capa II de la CE, las SS presentan una morfología preferentemente en herradura. En el caso de las sinapsis fragmentadas, un 88.2% se correspondió con SA, frente a un 11.8% de SS fragmentadas (Figura 31E).

En las muestras de la capa III de la CE del grupo con EA se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 973 SA. De las 973

SA, el 82.8% tenía una forma macular, el 10.2% perforada; el 4.3% en herradura y el 2.7% fragmentada (Tabla 7; Tabla suplementaria 12). En cuanto a las SS, se identificaron y reconstruyeron en 3D un total de 92 sinapsis. La mayoría de ellas, de nuevo, mostró una morfología macular (73.9%), seguida de herradura (10.9%), perforada (8.7%) y fragmentada (6.5%; Tabla 7; Tabla suplementaria 12).

Diferenciando por categoría morfológica en las muestras del grupo con EA, las sinapsis maculares se encontraron en una proporción de 92.2% de SA y 7.8% de SS. Esta proporción se mantuvo en el caso de las sinapsis perforadas, donde un 92.5% fueron SA y un 7.5% SS. En el caso de las sinapsis con morfología en herradura, esta proporción cambió ligeramente, encontrándose un 80.8% de SA y un 19.2% de SS. En el caso de las sinapsis fragmentadas, un 81.3% fueron SA y un 18.7% SS (Figura 31F).

El análisis de las posibles diferencias en la proporción de los distintos tipos morfológicos entre el grupo control y el grupo con EA reveló diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. En el grupo con EA se encontró que las SA fragmentadas y maculares eran más frecuentes, mientras que las SA perforadas fueron menos frecuentes que en el grupo control (χ^2 , $p < 0.0001$; Figura 32C). Al igual que en las otras dos capas, la muestra de SS no fue suficiente como para realizar un análisis estadístico robusto diferenciando cuatro categorías morfológicas, por lo que únicamente se diferenció entre SS maculares y SS no maculares. El análisis estadístico no reveló diferencias estadísticamente

significativas entre el grupo control y el grupo con EA (χ^2 , $p > 0.001$).

3.3. Tamaño y morfología sináptica

Además del análisis de la morfología sináptica, se determinó si la forma de las sinapsis estaba asociada con diferentes tamaños. Para ello, se analizaron el área y perímetro de la SAS de las SA y las SS en función de la morfología presentada.

3.3.1. Capa II de la CTE

Tanto en las muestras procedentes del grupo control como del grupo con EA de la capa II de la CTE, el área y el perímetro medio de la SAS de las SA maculares fue significativamente menor que el área y perímetro medio de la SAS de las SA perforadas, en herradura y fragmentadas (KW, $p < 0.0001$; Tabla 8; Tablas suplementarias 13 y 14; Figura 33). Aunque se observó la misma tendencia en el caso de las SS en el grupo control, no se aplicaron análisis estadísticos debido a que el número de SS no era suficiente. Cuando se compararon el área y perímetro medio de la SAS de las SA en función de su morfología entre ambos grupos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en las medias (MW; t-test, $p > 0.01$) ni en las distribuciones de frecuencias de ambos parámetros (KS, $p > 0.0001$).

3.3.2. Capa II de la CE

En las muestras de la capa II de la CE, tanto del grupo control como del grupo con EA, se encontró que el área y el perímetro me-

Grupo	Forma	Tipo sinapsis	Área SAS (nm ² ; media± sem)	Perímetro SAS (nm; media± sem)
Control	Macular	SA	89979±8285	1361±58
		SS	68605±5816	1295±38
	Perforada	SA	259165±8757	2821±106
		SS	108648±25833	2059±387
	Herradura	SA	247972±23191	3559±307
		SS	85174±16624	1841±114
	Fragmentada	SA	295792±47594	3212±668
		SS	-	-
Alzheimer	Macular	SA	94658±6833	1387±47
		SS	59827±6240	1226±75
	Perforada	SA	279237±24704	2870±25
		SS	109337±27619	1682±187
	Herradura	SA	232140±7922	3367±158
		SS	115312±0	2431±0
	Fragmentada	SA	274974±40813	2748±416
		SS	-	-

Tabla 8. Área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS maculares, perforadas, herradura y fragmentadas de la capa II de la CTE, en el grupo control y el grupo con EA. Todos los datos están corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos por casos individuales están recogidos en las tablas suplementarias 13 y 14.

dio de la SAS de las SA maculares fue significativamente menor que el área y el perímetro medio de la SAS de las SA perforadas, en herradura y fragmentadas (ANOVA, $p<0.001$; Tabla 9; Tablas suplementarias 15 y 16; Figura 34). Esta misma tendencia se observó para el caso de las SS. La comparación del área y perímetro medio de la SAS de las SA en función de su morfología entre

ambos grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas ni en las medias (MW; t-test, $p>0.001$) ni en las distribuciones de frecuencias de ambos parámetros (KS; $p>0.0001$).

3.3.3. Capa III de la CE

Al igual que en la capa II de la CTE y de la

Grupo	Forma	Tipo sinapsis	Área SAS (nm ² ; media± sem)	Perímetro SAS (nm; media± sem)
Control	Macular	SA	89406±1999	1389±21
		SS	53716±7280	1126±33
	Perforada	SA	218803±7373	2698±122
		SS	104339±22261	1730±413
	Herradura	SA	191238±14403	3242±274
		SS	84034±6931	2046±47
	Fragmentada	SA	199121±19630	2818±269
		SS	152108±0	2500±0
Alzheimer	Macular	SA	101410±13147	1474±88
		SS	50519±4291	1101±60
	Perforada	SA	290075±33353	3146±261
		SS	87027±14137	1584±95
	Herradura	SA	230872±27294	3296±196
		SS	95635±24799	1821±223
	Fragmentada	SA	329742±94617	3993±783
		SS	54638±11867	1323±150

Tabla 9. Área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las sinapsis maculares, perforadas, herradura y fragmentadas de la capa II de la CE, en el grupo control y el grupo con EA. Todos los datos están corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos por casos individuales están recogidos en las tablas suplementarias 15 y 16.

CE, tanto en las muestras control como en las muestras del grupo con EA procedentes de la capa III de la CE se encontró que el área y el perímetro medio de la SAS de las SA maculares fue significativamente menor que dichos parámetros en las SA perforadas, en herradura y fragmentadas (ANOVA, $p < 0.0001$; Tabla 10; Tablas suplementarias 17 y 18; Figura 35). La misma tendencia se

observó para el caso de las SS. La comparación del área y el perímetro medio de la SAS de las SA en función de su morfología entre ambos grupos no mostró diferencias estadísticamente significativas ni en las medias (MW; t-test, $p > 0.001$) ni en las distribuciones de frecuencias de ambos parámetros (KS; $p > 0.0001$).

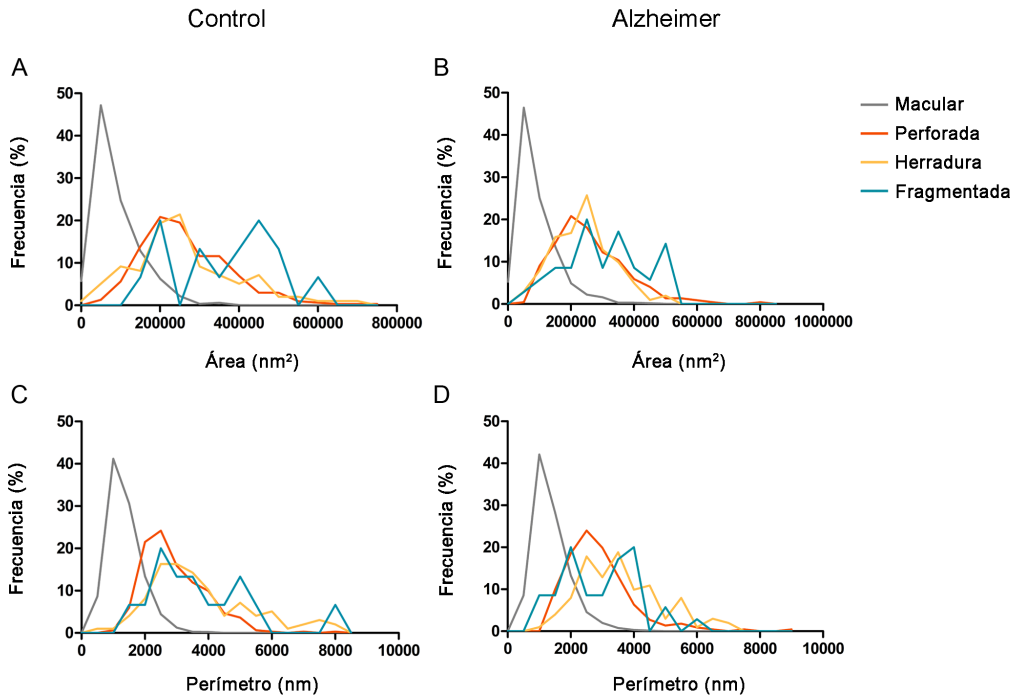


Figura 33. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa II de la CTE en función de la categoría morfológica, en el grupo control y en el grupo con EA. Las sinapsis con morfología macular fueron significativamente más pequeñas que las sinapsis con forma perforada, en herradura y fragmentada (KW, $p < 0.0001$), tanto en las muestras del grupo control como en las muestras del grupo con EA.

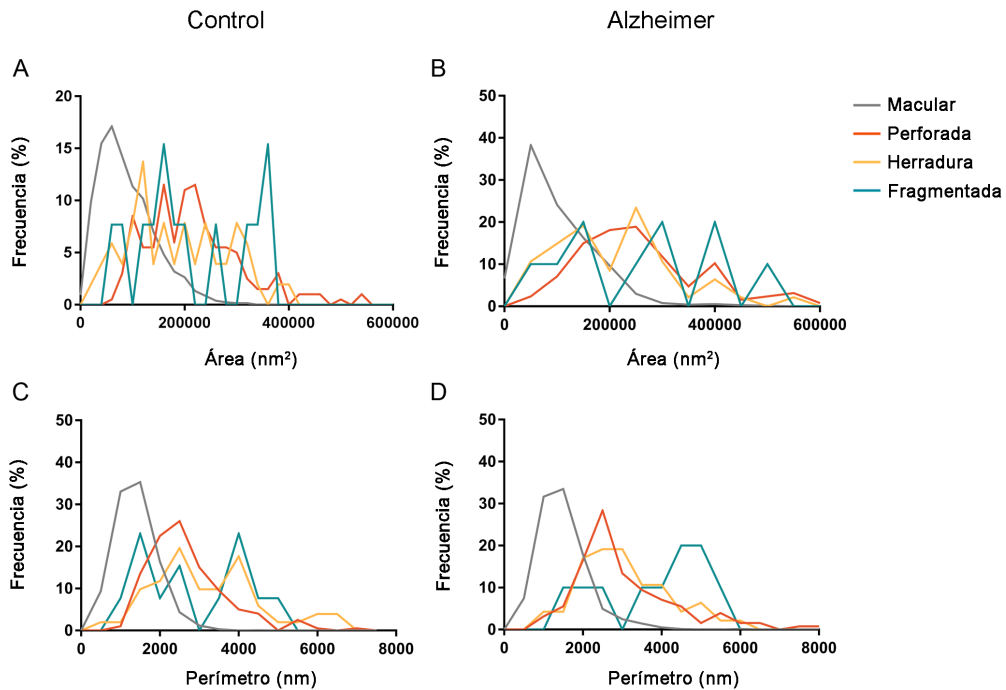


Figura 34. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa II de la CE en función de la categoría morfológica, en el grupo control y en el grupo con EA. Las sinapsis con morfología macular fueron significativamente más pequeñas que las sinapsis con forma perforada, en herradura y fragmentada (KW, $p < 0.0001$), tanto en las muestras del grupo control como en las muestras del grupo con EA.

Grupo	Forma	Tipo sinapsis	Área SAS (nm ² ; media± sem)	Perímetro SAS (nm; media± sem)
Control	Macular	SA	92737±3846	1430±33
		SS	65303±14798	1110±27
	Perforada	SA	228057±6993	2964±174
		SS	86820±5148	1695±87
	Herradura	SA	188362±9007	3447±340
		SS	157439±53309	2343±588
	Fragmentada	SA	303754±35891	4254±506
		SS	62518±5339	2583±1624
Alzheimer	Macular	SA	96162±6492	1412±48
		SS	47435±9453	1120±157
	Perforada	SA	296156±24116	3192±151
		SS	99845±47349	2723±868
	Herradura	SA	192661±19980	3117±283
		SS	127306±39972	2289±479
	Fragmentada	SA	250707±40241	3577±781
		SS	70021±43790	1758±908

Tabla 10. Área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las sinapsis maculares, perforadas, herradura y fragmentadas de la capa III de la CE, en el grupo control y el grupo con EA. Todos los datos están corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos por casos individuales están recogidos en las tablas suplementarias 17 y 18.

4. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS SINAPSIS EN EL NEUROPILO

4.1. Proporción y frecuencia de las sinapsis en los elementos postsinápticos

Como se describió en el apartado 3.4 de Materiales y Métodos, los elementos postsinápticos fueron clasificados en dos cate-

gorías principales: espinas dendríticas y tallos dendríticos. Cuando el elemento postsináptico se identificó como una espina dendrítica, se diferenció entre la localización de la sinapsis en el cuello o en la cabeza de la espina dendrítica. Cuando el elemento postsináptico se identificó como tallo dendrítico, se diferenció entre tallos dendríticos con o sin espinas (Figura 36).

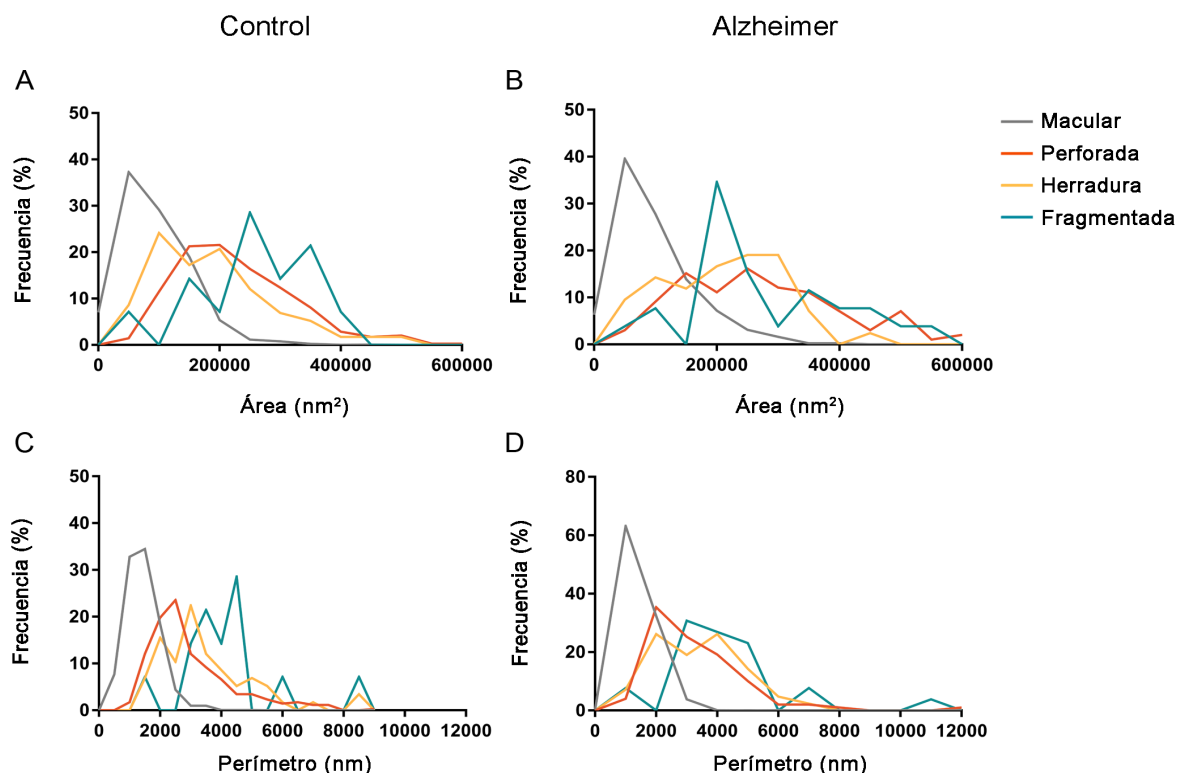


Figura 35. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa III de la CE en función de la categoría morfológica, en el grupo control y en el grupo con EA. Las sinapsis con morfología macular fueron significativamente más pequeñas que las sinapsis con forma perforada, en herradura y fragmentada (KW, $p < 0.0001$), tanto en las muestras del grupo control como en las muestras del grupo con EA.

4.1.1. Capa II de la CTE

En las muestras del grupo control de la capa II de la CTE se determinaron de forma clara los elementos postsinápticos de 1396 SA y 112 SS. Del total de SA, un 59.1% fueron SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas y un 0.5% SA establecidas en cuellos de espinas dendríticas. El resto de SA (40.4%) estaban establecidas en tallos dendríticos (20.5% en tallos dendríticos con espinas y un 19.9% en tallos dendríticos sin espinas; Tabla 11; Tabla suplementaria 19). En el caso de las SS, la distribución en los elementos postsinápticos fue completamente diferente: un 92.0% de las SS estaban establecidas en tallos dendríticos (53.6% en ta-

llos dendríticos con espinas y 38.4% en tallos dendríticos sin espinas); mientras que un 7.1% estaba establecido en cabezas de espinas dendríticas y el 0.9% restante en cuellos de espinas dendríticas (Tabla 11; Tabla suplementaria 19).

El análisis de las preferencias de las SA y SS por los diferentes elementos postsinápticos mostró que las SA y las SS presentaban una preferencia diferente por los mismos: las SA tenían una preferencia estadísticamente significativa por las cabezas de espinas dendríticas (de todas las sinapsis establecidas en cabezas de espinas dendríticas, un 99% eran SA, frente a un 1% de SS; χ^2 , $p < 0.0001$); mientras que las SS mostraban esa preferencia por los tallos dendríticos

Región	Grupo	Tipo de sinapsis	Sinapsis en cabeza	Sinapsis en cuello	Sinapsis en tallos sin espinas	Sinapsis en tallos con espinas	Nº Total sinapsis
Capa II CTE	Control	SA	59.1% (825)	0.5% (7)	19.9% (278)	20.5% (286)	100% (1396)
		SS	7.1% (8)	0.9% (1)	38.4% (43)	53.6% (60)	100% (112)
	Alzheimer	SA	50.2% (579)	0.7% (8)	28.0% (323)	21.1% (243)	100% (1153)
		SS	8.8% (9)	1.0% (1)	41.2% (42)	49.0% (50)	100% (102)
Capa II CE	Control	SA	49.0% (567)	0.7% (8)	24.5% (284)	25.8% (298)	100% (1157)
		SS	10.4% (13)	1.6% (2)	25.0% (31)	63.0% (78)	100% (124)
	Alzheimer	SA	43.4% (289)	0.9% (6)	30.3% (202)	25.4% (169)	100% (666)
		SS	11.0% (9)	0% (0)	50.0% (41)	39.0% (32)	100% (82)
Capa III CE	Control	SA	46.7% (639)	0.9% (12)	20.6% (281)	31.8% (435)	100% (1367)
		SS	13.3% (16)	2.5% (3)	22.5% (27)	61.7% (74)	100% (120)
	Alzheimer	SA	46.7% (330)	1.0% (7)	31.6% (223)	20.7% (146)	100% (706)
		SS	5.9% (5)	3.6% (3)	39.3% (33)	51.2% (43)	100% (84)

Tabla 11. Proporción de SA y SS establecidas en cabezas de espinas dendríticas, cuellos de espinas dendríticas, tallos dendríticos sin espinas y tallos dendríticos con espinas en la capa II de la CTE y en las capas II y III de la CE, en el grupo control y el grupo con EA. Entre paréntesis se muestran los valores absolutos. Los datos por casos individuales están recogidos en las tablas suplementarias 19, 20 y 21.

(χ^2 , $p < 0.0001$), tanto por los tallos dendríticos sin espinas (que recibieron un 86.6% de SA y un 13.4% de SS), como por los tallos dendríticos con espinas (que recibieron un 82.7% de SA y un 17.3% de SS). Teniendo en

cuenta que la proporción de sinapsis establecidas en cabezas de espinas dendríticas y en tallos dendríticos fue de 56:44, y que la proporción general de SA y SS es de 95:5, los dos tipos sinápticos (SA y SS) muestran

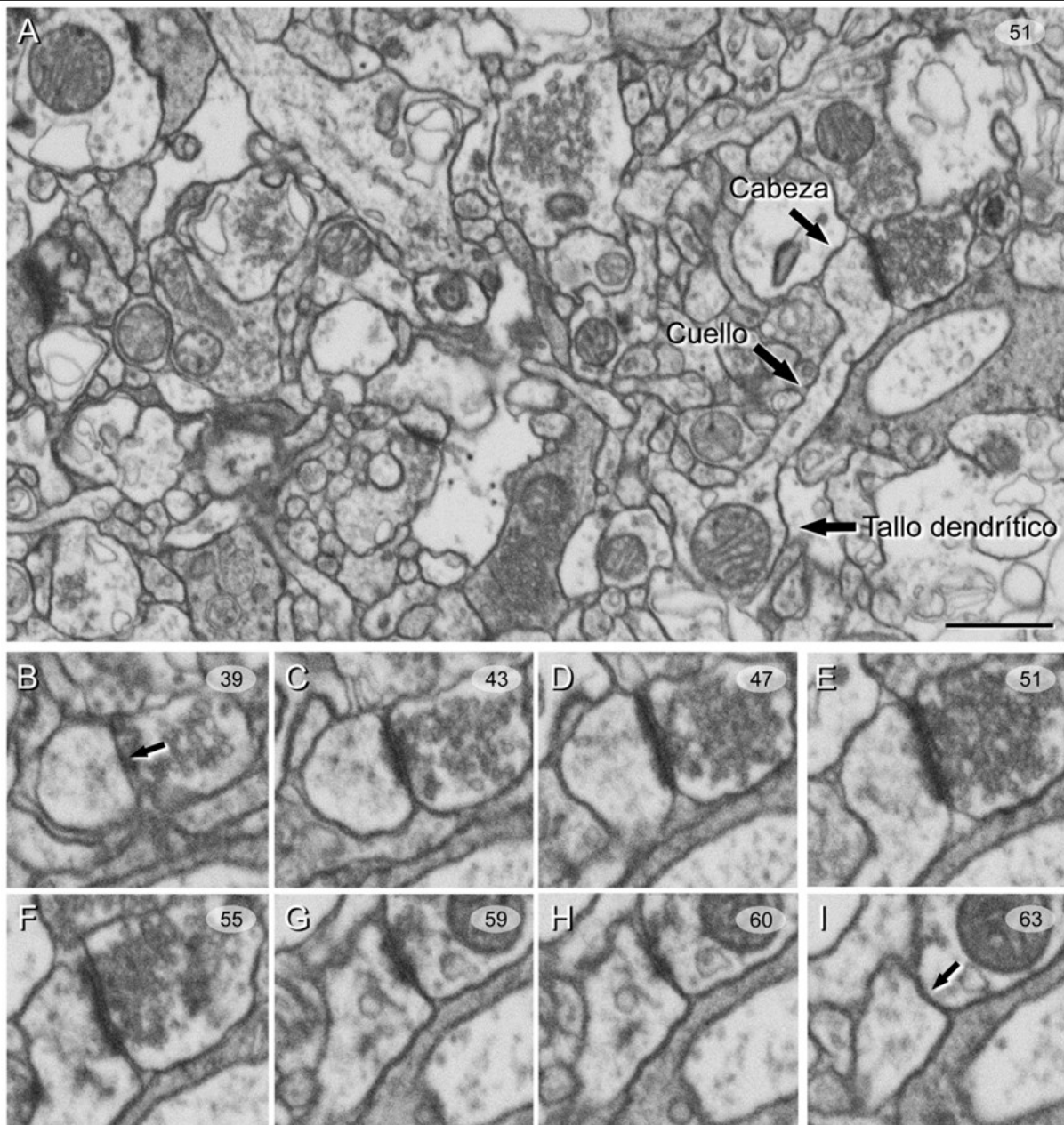


Figura 36. Serie de imágenes del neuropilo humano de la capa II de la CTE de un sujeto con EA (IF1) obtenidas con el microscopio FIB/SEM. A: Microfotografía mostrando la cabeza y el cuello de una espina emergiendo de un tallo dendrítico. **B-I:** Serie de imágenes (de la 39 a la 63) de una serie de imágenes seriadas donde se ilustra una SA sobre una cabeza de una espina. Las flechas (en B e I) indican el comienzo y final, respectivamente, de la sinapsis sobre la cabeza. Barra de escala (en A): 850nm en A y 500nm en B-I.

una clara preferencia por un elemento post-sináptico en particular. Esta preferencia no se encontró en el caso de los cuellos de las espinas dendríticas (χ^2 , $p=0.46$), donde un 87.5% de los contactos sinápticos eran de SA y un 12.5% de SS. Esta distribución de SA y SS en los cuellos dendríticos no difiere sig-

nificativamente de la proporción general de ambos tipos de sinapsis (95:5; SA: SS), por lo que los valores obtenidos en los cuellos de las espinas dendríticas (88:12; SA: SS, aproximadamente) podría ser debido al azar y no a una preferencia por ese elemento postsináptico.

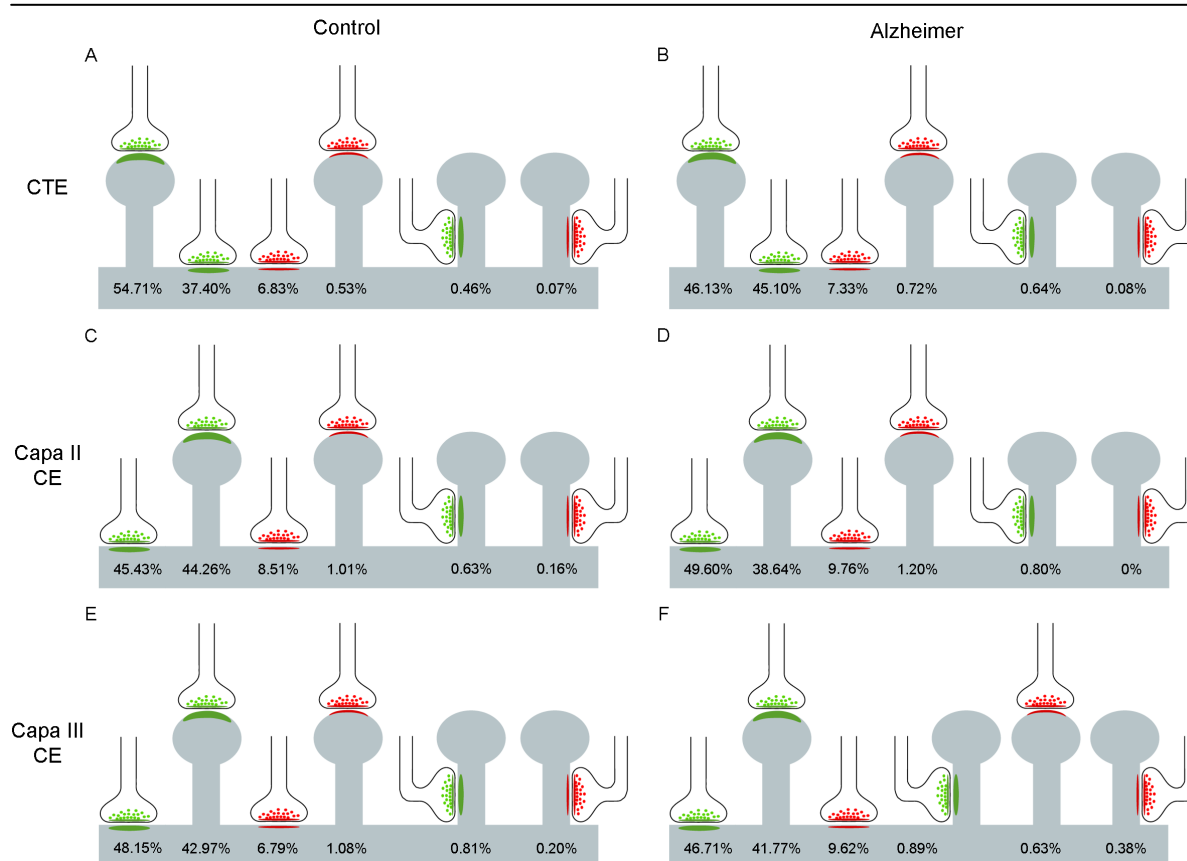


Figura 37. Representación de la distribución de SA (en verde) y SS (en rojo) en espinas y tallos dendríticos en la capa II de la CTE (A y B) y en las capas II (C y D) y III (E y F) de la CE, tanto en el grupo control (izquierda) como en el grupo con EA (derecha). Las sinapsis establecidas en las espinas dendríticas han sido subdivididas en aquellas establecidas en la cabeza o en el cuello de la espina dendrítica.

Si se diferencian las sinapsis de acuerdo a su tipo (SA o SS) y su diana postsináptica (cabeza de espinas dendríticas, cuello de espina dendrítica o tallos dendríticos), la mayoría de las sinapsis son SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas (54.7%), seguidas de SA en tallos dendríticos (37.4%). El 6.8% son SS establecidas en tallos dendríticos y el 0.5% SS en cabezas de espinas dendríticas. Las sinapsis establecidas en cuellos de espinas dendríticas son las menos frecuentes, encontrando un 0.5% de SA y un 0.1% de SS en cuellos de espinas dendríticas (Figura 37A). Dentro de las sinapsis que fueron establecidas en cabezas de espinas dendríticas, se estudió la presencia de

múltiples sinapsis en las mismas. Se encontró que el 94.5% mostraban una única SA. El 5.5% restante de sinapsis establecidas en una misma cabeza de espina dendrítica fueron sinapsis múltiples en las siguientes combinaciones: 3.6% fueron dos SA y un 1.9% fueron una SA y una SS (Figura 38A).

En el caso de las muestras procedentes de la capa II de la CTE del grupo con EA se identificaron de forma clara los elementos postsinápticos de un total de 1153 SA y 102 SS. Del total de SA, un 50.2% estaban establecidas en cabezas de espinas dendríticas, y un 0.7% en cuellos de espinas dendríticas. Del 49.1% de SA restantes, el 28.0% fueron SA establecidas en tallos dendríticos sin es-

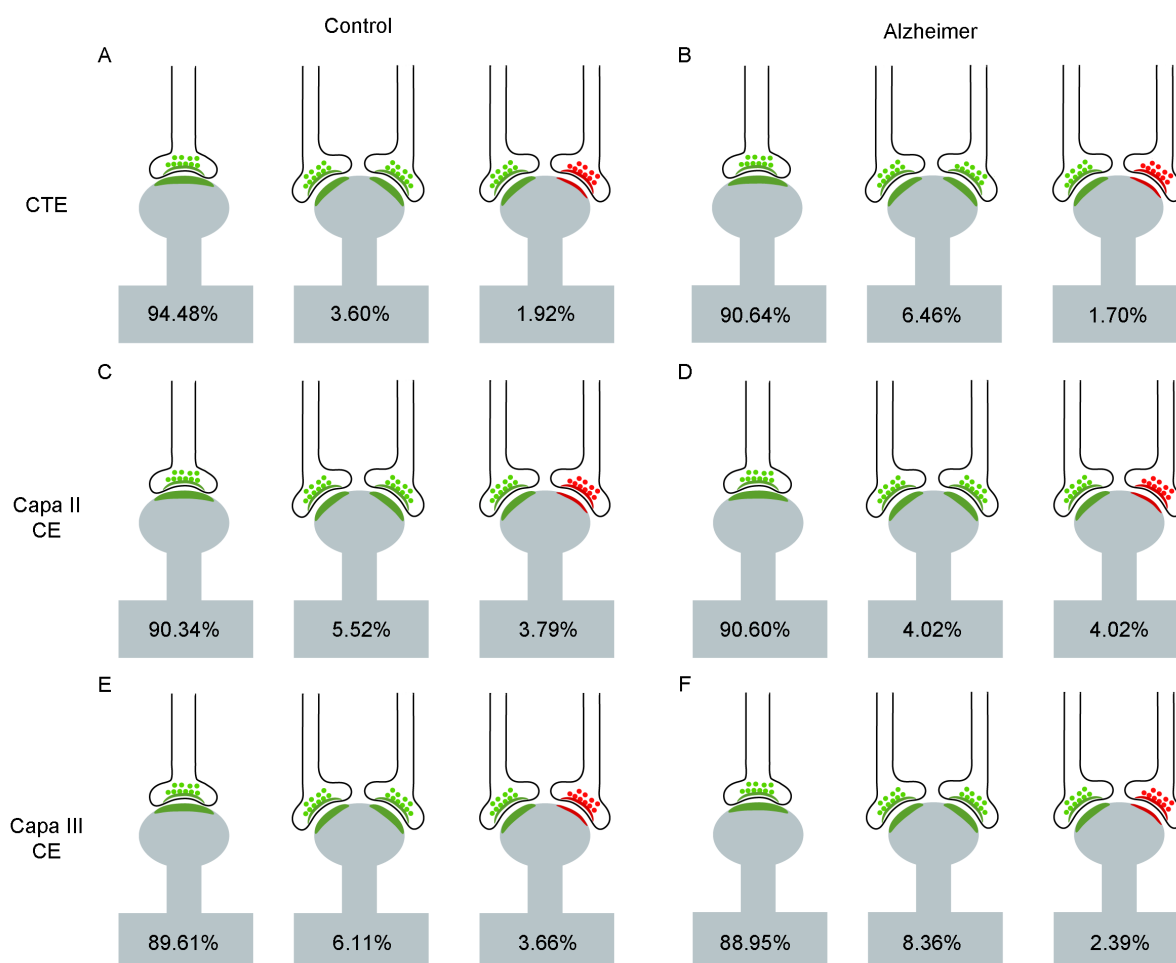


Figura 38. Representación de sinapsis únicas y múltiples sinapsis establecidas sobre la misma cabeza de una espina dendrítica en la capa II de la CTE (A y B) y en las capas II (C y D) y III (E y F) de la CE, tanto en el grupo control (izquierda) como en el grupo con EA (derecha). Las sinapsis encontradas en una proporción menor del 1.0% no han sido representadas. Las sinapsis asimétricas han sido representadas en verdes y las simétricas en rojo.

pinas y el 21.1% SA en tallos dendríticos con espinas (Tabla 11; Tabla suplementaria 19). Las SS, en cambio, mostraron un patrón completamente diferente: el 90.2% de las SS estaban establecidas en tallos dendríticos (49.0% en tallos dendríticos con espinas y 41.2% en tallos dendríticos sin espinas). Un pequeño porcentaje de SS estaban establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas (8.8% y 1.0%, respectivamente; Tabla 11; Tabla suplementaria 19). Teniendo en cuenta los elementos postsinápticos, se determinó de nuevo si las SA

y las SS presentaban preferencia por algún elemento postsináptico concreto, y se encontró una distribución similar a los casos control: las SA presentaron una preferencia significativa por establecerse en las cabezas de las espinas dendríticas (un 98.5% de las sinapsis establecidas en cabezas dendríticas fueron SA y un 1.5% SS; χ^2 , $p < 0.0001$); mientras que las SS mostraron una preferencia significativa por establecerse en los tallos dendríticos (un 82.9% de las sinapsis establecidas en tallos dendríticos con espinas fueron SS y un 17.1% SA; similarmente,

un 88.5% de las sinapsis establecidas en los tallos dendríticos sin espinas fueron SS y un 11.5% SA; χ^2 , $p < 0.0001$). Esta preferencia significativa no se encontró en el caso de las sinapsis establecidas en los cuellos de las espinas dendríticas, donde un 88.9% de las sinapsis establecidas en los cuellos de las espinas dendríticas fueron SA y un 11.1% SS (χ^2 , $p = 0.54$).

Al diferenciar las sinapsis por su tipo (SA o SS) y su elemento postsináptico (cabeza de espina dendrítica, cuello de espina dendrítica o tallos dendríticos) se encontró que la combinación más frecuente fue, al igual que las muestras del grupo control, la de SA en cabezas de espinas dendríticas (46.1%), seguida de SA establecidas en tallos dendríticos (45.1%). Menos frecuentes fueron las SS localizadas en tallos dendríticos (7.3%), y aún menos frecuentes las SS establecidas en cabezas de espinas dendríticas (0.7%). Las sinapsis establecidas en cuellos de espinas dendríticas fueron las más escasas (0.7% de SA y 0.1% de SS; Figura 37B). Atendiendo a las sinapsis que fueron establecidas en las cabezas de las espinas dendríticas, un 90.6% fueron una única SA, mientras que una única SS en una cabeza de espina dendrítica apareció en una proporción de un 0.2%. El resto, fueron sinapsis múltiples establecidas en una misma cabeza de una espina dendrítica en las siguientes proporciones: 6.5% fueron dos SA en la misma cabeza; 1.0% dos SA y una SS en la misma cabeza; y, finalmente, un 1.7% fueron una SA y una SS establecidas en la misma cabeza (Figura 38B).

Para evaluar posibles cambios en la distribución de los elementos postsinápticos en las muestras de la capa II de la CTE de los

pacientes con EA se realizaron tablas de contingencia. Con relación a las SA, se encontró que había una disminución significativa de las SA establecidas en las cabezas de las espinas dendríticas (χ^2 , $p < 0.001$), y un aumento significativo de las SA establecidas en los tallos dendríticos sin espinas (χ^2 , $p < 0.001$; Figura 39A y B). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación a las SA establecidas en los cuellos de las espinas dendríticas (χ^2 , $p = 0.71$; Figura 39A y B). Como el número de SS no fue suficiente como para realizar un análisis estadístico robusto, se establecieron solamente dos categorías de elementos postsinápticos: SS establecidas en espinas y SS establecidas en tallos dendríticos. Igualmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon ambas categorías entre el grupo control y el grupo con EA (χ^2 , $p = 0.81$).

4.1.2. Capa II de la CE

En las muestras del grupo control de la capa II de la CE se determinaron los elementos postsinápticos de 1157 SA y 124 SS. Del total de SA, un 49.0% fueron SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas y un 0.7% SA establecidas en cuellos de espinas dendríticas. Del resto de SA, un 51.9%, estaban establecidas en tallos dendríticos (25.8% en tallos dendríticos con espinas y un 24.5% en tallos dendríticos sin espinas; Tabla 11; Tabla suplementaria 20). En el caso de las SS, la preferencia por los elementos postsinápticos fue completamente diferente: un 88.0% de las SS estaban establecidas en tallos dendríticos (63.0% en tallos dendríticos con espinas y 25.0% en tallos dendríticos sin espinas); mientras que

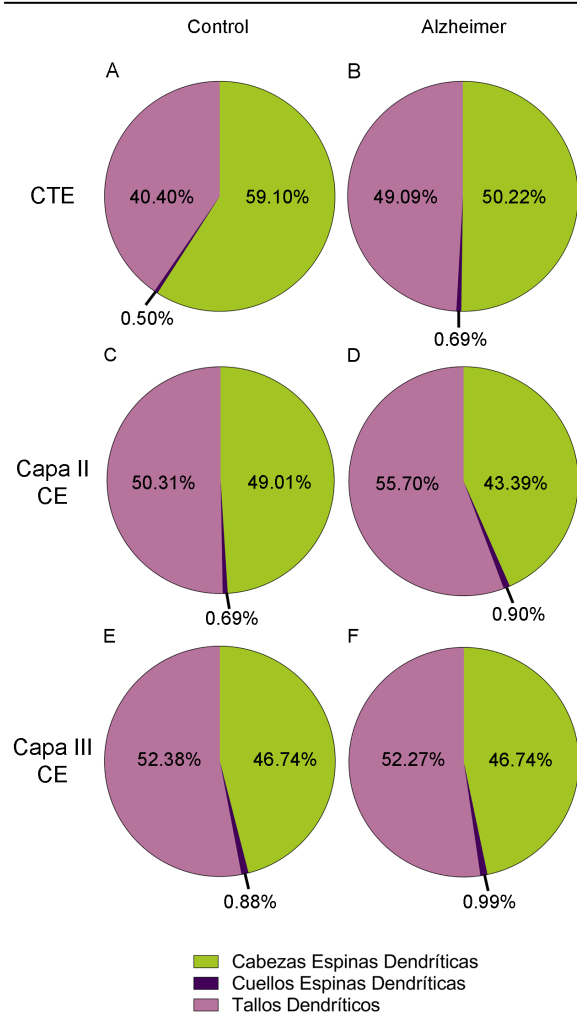


Figura 39. Proporción de SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas, cuellos de espinas dendríticas y tallos dendríticos en la capa II de la CTE (A y B) y en las capas II (C y D) y III (E y F) de la CE, tanto en el grupo control (izquierda) como en el grupo con EA (derecha). En el caso de la capa II de la CTE se encontró en el grupo con EA una disminución significativa de las SA establecidas en las cabezas de las espinas dendríticas (χ^2 , $p < 0.001$), y un aumento significativo de las SA establecidas en los tallos dendríticos sin espinas (χ^2 , $p < 0.001$).

el 10.4% estaba establecido en cabezas de espinas dendríticas y el 1.6% restante en cuellos de espinas dendríticas (Tabla 11; Tabla suplementaria 20).

Cuando se realizó el análisis de las preferencias de las SA y las SS por un elemento postsináptico concreto se encontró que am-

bos tipos de sinapsis presentaban preferencias diferentes: las SA mostraban una preferencia estadísticamente significativa por las cabezas de las espinas dendríticas (χ^2 , $p < 0.0001$), mientras que las SS mostraban esa preferencia estadísticamente significativa por los tallos dendríticos (χ^2 , $p < 0.0001$). Estas diferencias no se encontraron en el caso de las sinapsis establecidas en los cuellos de las espinas dendríticas (χ^2 , $p = 0.25$). En el caso de todas las sinapsis establecidas en las cabezas de las espinas dendríticas, la proporción fue de un 97.8% de SA y un 2.2% de SS; mientras que en el caso de las sinapsis establecidas en los tallos dendríticos dicha proporción fue de 84.2% de SA y 15.8% de SS. Teniendo en cuenta que la proporción de SA y SS en la capa II de la CE fue de 92:8, respectivamente, las SA y las SS sí que mostraron preferencia por un elemento postsináptico determinado, es decir, las SA mostraban una preferencia por establecerse en las cabezas de las espinas dendríticas, mientras que las SS mostraban preferencia por establecerse en los tallos dendríticos.

Al diferenciar tanto por tipo de sinapsis (SA o SS) como por tipo de diana postsináptica (cabeza de espinas dendrítica, cuello de espinas dendrítica o tallos dendríticos) se encontró que, de todas las sinapsis de la capa II de la CE, un 45.4% fueron SA establecidas en tallos dendríticos, seguidas de SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas (44.3%). Del resto, un 8.5% fueron SS en tallos dendríticos, y un 1.0% SS en cabezas de espinas dendríticas. Las combinaciones menos frecuentes fueron las de SA y SS establecidas en cuellos de espinas dendríticas (0.6% y 0.2%, respectivamente; Figura 37C). Teniendo en cuenta las sinapsis estableci-

das solamente en cabezas de espinas dendríticas, se analizó la presencia de múltiples sinapsis en una misma cabeza. De todas las sinapsis establecidas en cabezas de espinas dendríticas, lo más frecuente fue la presencia de una única SA en la cabeza (90.3%), seguido de dos SA (5.5%). Del resto de sinapsis en cabezas, un 3.8% fueron una SA y una SS establecidas en la misma cabeza, mientras que la presencia de una única SS en una cabeza fue escasa (0.4%; Figura 38C).

En relación con las muestras del grupo con EA de la capa II de la CE, se identificaron de forma clara los elementos postsinápticos de un total de 666 SA y 82 SS. De las 666 SA, un 43.4% fueron SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas; seguidas de un 55.7% en tallos dendríticos (un 30.3% en tallos dendríticos sin espinas y un 25.4% en tallos dendríticos con espinas) y, finalmente, un 0.9% en cuellos de espinas dendríticas (Tabla 11; Tabla suplementaria 20). En el caso de las 82 SS, la mayoría estaban establecidas en tallos dendríticos: un 50.0% en tallos dendríticos sin espinas y un 39.0% en tallos dendríticos con espinas. El 11.0% restante fueron SS establecidas en cabezas de espinas dendríticas. En este caso, no se encontraron SS establecidas en cuellos de espinas dendríticas (Tabla 11; Tabla suplementaria 20).

Cuando se analizó la preferencia de las SA y las SS por un tipo de elemento postsináptico, de nuevo se encontró que las SA presentaban una preferencia estadísticamente significativa por las cabezas de las espinas dendríticas (χ^2 , $p < 0.0001$), encontrándose un 97.0% de SA y un 3.0% de SS en cabezas de espinas dendríticas; mientras que las SS mostraron una preferencia estadísticamen-

te significativa por los tallos dendríticos (χ^2 , $p < 0.0001$), presentándose un 83.6% de SA y un 16.4% de SS en tallos dendríticos. Teniendo en cuenta que la proporción de SA y SS en las muestras de la capa II de la CE de los pacientes con EA fue de 91:9, respectivamente, se podría confirmar que ambos tipos de sinapsis muestran preferencia por un elemento postsináptico determinado. De nuevo, las SA presentaron preferencia por establecerse en las cabezas de las espinas dendríticas, mientras que las SS presentaron preferencia por establecerse en los tallos dendríticos. Estas diferencias de preferencia por los diferentes elementos postsinápticos no se encontraron en el caso de los cuellos de las espinas dendríticas (χ^2 , $p = 1.00$).

Al diferenciar tanto por tipo de sinapsis (SA o SS) como por tipo de diana postsináptica (cabeza de espinas dendrítica, cuello de espina dendrítica o tallos dendríticos) se encontró que, de todas las sinapsis de la capa II de la CE de las muestras procedentes de pacientes con EA, un 49.6% fueron SA establecidas en tallos dendríticos, seguidas de SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas (38.6%). Del resto, un 9.8% fueron SS en tallos dendríticos, y un 1.2% SS en cabezas de espinas dendríticas. El 0.8% restante fueron SA en cuellos de espinas dendríticas, no encontrándose SS establecidas en los mismos; Figura 37D). En relación a las sinapsis establecidas en la cabeza de una espina dendrítica, se identificó la presencia de múltiples sinapsis en cabezas de espinas dendríticas. La combinación más frecuente de nuevo fue la presencia de una única SA en la cabeza de una espina dendrítica (90.6%), seguida de dos SA en la misma cabeza (4.0%) y una SA y una SS estableci-

das en la misma cabeza de una espina dendrítica (4.0%). Del resto de sinapsis establecidas en cabezas, un 0.7% se correspondieron tanto con una SS en una cabeza como con dos SA y una SS establecidas en la misma cabeza (Figura 38D).

Para evaluar posibles cambios en la distribución de los elementos postsinápticos en las muestras de la capa II de la CE de los pacientes con EA se realizaron tablas de contingencia. Con relación a las SA, aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de SA establecidas en los diferentes elementos postsinápticos (χ^2 , $p>0.001$), se observó una ligera disminución de las SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas y un aumento de las mismas en tallos dendríticos (χ^2 , $p=0.02$; $p=0.03$; Figura 39C y D). Como el número de SS no fue suficiente como para realizar un análisis estadístico robusto, de nuevo se establecieron solamente las dos categorías de elementos postsinápticos de SS establecidas en espinas y en tallos dendríticos. Al hacer el análisis estadístico, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas categorías entre el grupo control y el grupo con EA (χ^2 , $p=0.83$).

4.1.3. Capa III de la CE

De las muestras control de la capa III de la CE se identificaron de forma clara los elementos postsinápticos de 1367 SA. De ese total, un 46.7% estaban establecidas en cabezas de espinas dendríticas, y un 0.9% en cuellos. Del resto, un 20.6% estaban haciendo sinapsis en tallos dendríticos sin espinas, mientras que un 31.8% se encontraban en

tallos dendríticos con espinas (Tabla 11; Tabla suplementaria 21). En el caso de las SS, se determinaron de forma concisa los elementos postsinápticos de 120 SS. En este caso, la mayoría estaban establecidas en tallos dendríticos (un 61.7% en tallos dendríticos con espinas y un 22.5% en tallos dendríticos sin espinas), mientras que un 13.3% se encontraron en cabezas de espinas dendríticas y un 2.5% en cuellos (Tabla 11; Tabla suplementaria 21). Cuando se analizó la preferencia de los dos tipos sinápticos (SA o SS) por un tipo de elemento postsináptico (cabezas o cuellos de espinas dendríticas o tallos dendríticos) se observó, al igual que las otras dos capas analizadas, que las SA presentaban una preferencia estadísticamente significativa por las cabezas de las espinas dendríticas (χ^2 , $p < 0.0001$); mientras que las SS mostraban esa preferencia estadísticamente significativa por los tallos dendríticos (χ^2 , $p < 0.0001$). En el caso de las sinapsis establecidas en las cabezas de las espinas dendríticas, un 97.6% fueron SA y un 2.4% SS. En el caso de las sinapsis establecidas en los tallos dendríticos, la proporción de SA y SS fue de 87.6% y 12.4%, respectivamente. Dado que la proporción de SA y SS en la capa III de la CE fue de 92:8, respectivamente, se podría concluir que las SA y las SS sí presentan preferencia por un elemento postsináptico concreto. Es decir, las SA presentaron preferencia por establecerse en las cabezas de las espinas dendríticas y las SS en los tallos dendríticos. Aunque en el caso de las sinapsis establecidas en los cuellos dendríticos se observó un incremento de SS en los mismos en relación a lo que cabría esperar por azar dada la proporción de SA y SS en la capa III de la CE, la muestra no fue lo suficientemente grande como pa-

ra extraer conclusiones estadísticamente fiables.

Cuando se tuvieron en cuenta tanto el tipo sináptico (SA o SS) como el elemento postsináptico donde estaba establecida la sinapsis (cabeza de espina dendrítica, cuello de espina dendrítica o tallo dendrítico), se encontró que la combinación más frecuente fue la de SA en tallo dendrítico (48.1%), seguida de SA en cabeza de espina dendrítica (43.0%). Del resto, un 6.8% fueron SS en tallos dendríticos y un 1.1% SS en cabezas de espinas dendríticas. Las combinaciones menos frecuentes fueron las de las sinapsis establecidas en cuellos de espinas dendríticas (un 0.8% fueron SA en cuellos y un 0.2% SS en cuellos; Figura 37E). En relación a la presencia de sinapsis simples o múltiples sinapsis establecidas en una misma cabeza de una espina dendrítica, lo más frecuente fue la presencia de una única SA sobre una cabeza (89.6%), seguida de dos SA establecidas sobre la misma cabeza (6.1%). La siguiente combinación más frecuente fue la de una SA y una SS sobre la misma cabeza (3.7%), siendo las combinaciones menos frecuentes las de una SS y dos SS sobre una cabeza (0.3% y 0.3%, respectivamente; Figura 38E).

En el caso de las muestras de la capa III de la CE procedentes de los pacientes con EA se identificaron los elementos postsinápticos de 706 SA. De esas 706 SA, un 46.7% estaban establecidas en cabezas de espinas dendríticas y un 1.0% en cuellos. Del resto, un 31.6% se encontraron sobre tallos dendríticos sin espinas y un 20.7% sobre tallos dendríticos con espinas (Tabla 11; Tabla suplementaria 21). En relación a las SS, se identificaron los elementos postsinápticos de un total de 84 SS. En este caso, la mayo-

ría de las sinapsis se encontraron sobre tallos dendríticos: un 51.2% estaban establecidas en tallos dendríticos con espinas y un 39.3% sobre tallos dendríticos sin espinas. El resto de las sinapsis estaban establecidas sobre espinas dendríticas, encontrándose un 5.9% sobre cabezas de espinas dendríticas y un 3.6% sobre cuellos (Tabla 11; Tabla suplementaria 21).

El estudio de la preferencia de cada tipo sináptico (SA o SS) por un elemento postsináptico determinado (cabeza o cuello de espina dendrítica o tallo dendrítico) mostró que, de nuevo, las SA presentaban una preferencia estadísticamente significativa por las cabezas de las espinas dendríticas (χ^2 , $p < 0.0001$), encontrándose que un 98.5% de las sinapsis establecidas en cabezas fueron SA y un 1.5% SS. En el caso de las SS, se encontró que dichas sinapsis presentaban preferencia estadísticamente significativa por los tallos dendríticos: un 82.9% de las sinapsis establecidas en tallos dendríticos fueron SA y un 17.1% fueron SS (χ^2 , $p < 0.0001$). Teniendo en cuenta que la proporción de SA y SS en las muestras de la capa III de la CE del grupo con EA fue de 92:8, se puede concluir que la distribución de dichas sinapsis en cabezas y tallos dendríticos no se debe al azar y que dichas sinapsis muestran diferentes preferencias por establecerse en un elemento postsináptico concreto. En el caso de las sinapsis establecidas en los cuellos de las espinas dendríticas, la muestra no fue lo suficientemente grande como para sacar conclusiones estadísticas.

Teniendo en cuenta tanto el tipo sináptico (SA o SS) como el elemento postsináptico donde las sinapsis estaban establecidas (cabeza de espina dendrítica, cuello de es-

Grupo	Elemento postsináptico	Tipo sinapsis	Área SAS (nm ² ; media± sem)	Perímetro SAS (nm; media± sem)
Control	Cabeza	SA	143956±11044	1864±94
		SS	74450±16761	1295±197
	Cuello	SA	73349±25111	1288±319
		SS	19199±0	628±0
	Tallo	SA	113001±5027	1610±28
		SS	74195±6070	1434±35
Alzheimer	Cabeza	SA	144996±12302	1849±50
		SS	53173±25924	1046±286
	Cuello	SA	56906±9716	1104±126
		SS	55339±0	1269±0
	Tallo	SA	119188±5947	1625±64
		SS	64180±7912	1277±91

Tabla 12. Área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las sinapsis establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y tallos dendríticos en la capa II de la CTE, en el grupo control y el grupo con EA. Todos los datos están corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos por casos individuales están recogidos en las tablas suplementarias 22 y 23.

pina dendrítica o tallo dendrítico) se encontró que lo más frecuente fue la presencia de SA establecidas sobre tallos dendríticos (46.7%), seguidas de SA en cabezas de espinas dendríticas (41.8%) y SS en tallos dendríticos (9.6%). Las combinaciones menos frecuentes fueron las de SA en cuellos de espinas dendríticas (0.9%), SS en cabezas de espinas dendríticas (0.6%) y SS en cuellos de espinas dendríticas (0,4%; Figura 37F). En relación a la presencia de múltiples sinapsis sobre una misma cabeza de espina dendrítica, lo más frecuente fue una SA establecida sobre una cabeza (88.9%), segui-

da de la presencia de dos SA (8.4%). Del resto, un 2.4% fueron una SA y una SS sobre la misma cabeza, mientras que la presencia de una única SS sobre una cabeza de espina dendrítica fue escasa (0.3%; Figura 38F).

Para evaluar posibles cambios en la distribución de los elementos postsinápticos en las muestras de la capa III de la CE de los pacientes con EA se realizaron tablas de contingencia. En relación con las SA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en rela-

Grupo	Elemento postsináptico	Tipo sinapsis	Área SAS (nm ² ; media± sem)	Perímetro SAS (nm; media± sem)
Control	Cabeza	SA	126781±4589	1830±108
		SS	45013±3411	1141±88
	Cuello	SA	53400±8724	1163±95
		SS	57667±17123	1239±341
	Tallo	SA	109549±5595	1600±46
		SS	69472±6469	1463±66
Alzheimer	Cabeza	SA	151535±14258	1968±101
		SS	42975±6883	1054±100
	Cuello	SA	140166±38879	2089±370
		SS	-	-
	Tallo	SA	141239±24418	1825±167
		SS	63001±9319	1284±97

Tabla 13. Área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las sinapsis establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y tallos dendríticos en la capa II de la CE, en el grupo control y el grupo con EA. Todos los datos están corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos por casos individuales están recogidos en las tablas suplementarias 24 y 25.

ción con las sinapsis establecidas en cabezas de espinas dendríticas, cuellos de espinas dendríticas y tallos dendríticos (χ^2 , $p > 0.001$; Figura 39E y F). Dado que el número de SS no era suficiente como para realizar un análisis estadístico robusto, se establecieron las mismas categorías que en la capa II de la CTE y la CE: SS establecidas en espinas y SS establecidas en tallos dendríticos. Al comparar ambas categorías, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos (χ^2 , $p=0.21$).

4.2. Tamaño y elementos postsinápticos

Además del estudio de la distribución de sinapsis en los diferentes elementos postsinápticos, se determinó si había relación entre el tamaño de la sinapsis y el elemento postsináptico donde estaba establecida. El estudio se realizó con los datos del área y perímetro de la SAS de cada una de las sinapsis de las cuales se pudo identificar su elemento postsináptico sin ambigüedad.

Grupo	Elemento postsináptico	Tipo sinapsis	Área SAS (nm ² ; media± sem)	Perímetro SAS (nm; media± sem)
Control	Cabeza	SA	142580±5780	2071±151
		SS	52713±9309	1153±165
	Cuello	SA	123117±64084	2119±969
		SS	76204±5195	1413±118
	Tallo	SA	119061±8818	1718±56
		SS	70837±2520	1448±71
Alzheimer	Cabeza	SA	150849±16015	1968±202
		SS	44765±4954	1044±58
	Cuello	SA	100322±31533	1709±351
		SS	18997±2596	661.4±79
	Tallo	SA	117723±11129	1644±98
		SS	59723±13739	1389±267

Tabla 14. Área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las sinapsis establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y tallos dendríticos en la capa III de la CE, en el grupo control y el grupo con EA. Todos los datos están corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos por casos individuales están recogidos en las tablas suplementarias 26 y 27.

4.2.1. Capa II de la CTE

En el caso de las SA procedentes tanto de las muestras del grupo control como del grupo con EA, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de las sinapsis establecidas en cabezas de espinas dendríticas, cuellos de espinas dendríticas o tallos dendríticos (KW, $p>0.001$; Tabla 12; Tablas suplementarias 22 y 23). En el caso de las SS, el número de las mismas no fue suficiente como para realizar un análisis estadístico robusto. Cuando se compararon los tamaños de las SA en

función de su elemento postsináptico entre ambos grupos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en las medias del área y perímetro de las sinapsis (MW, $p>0.001$) ni tampoco en las distribuciones de frecuencias de las mismas (KS, $p>0.001$; Figura 40).

4.2.2. Capa II de la CE

En las muestras de la capa II de la CE del grupo control se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño medio del área de la SAS de las SA esta-

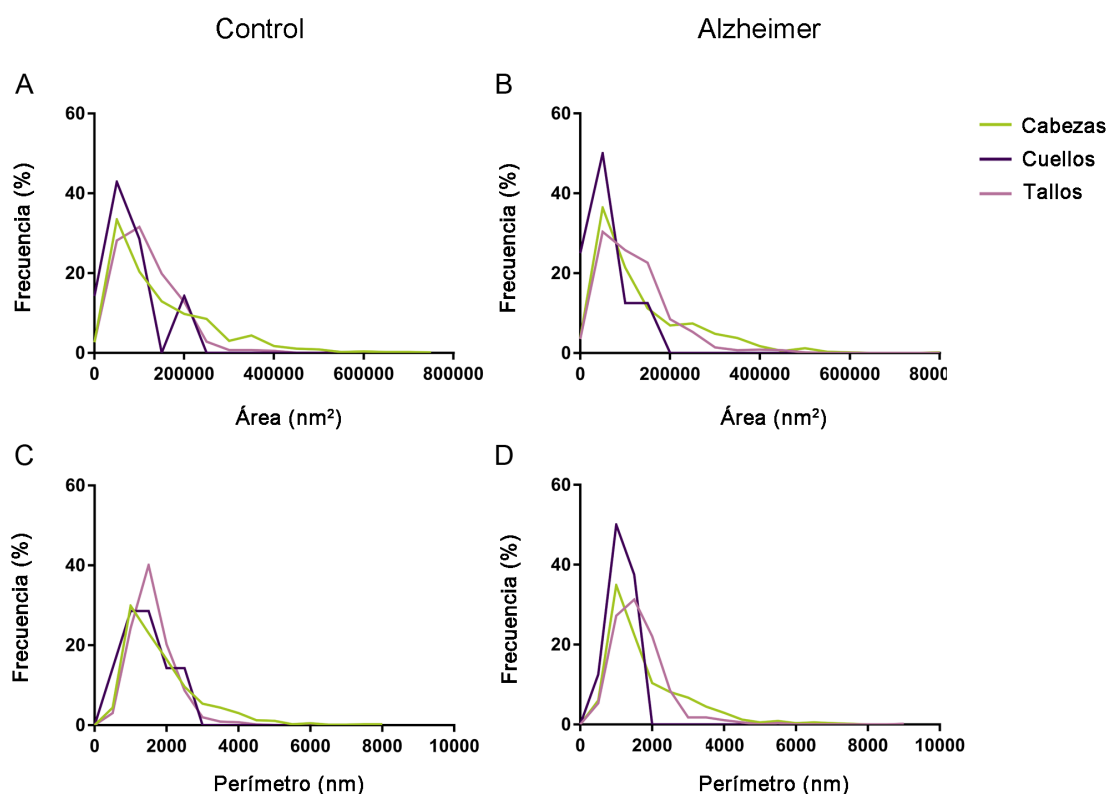


Figura 40. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa II de la CTE en función del elemento postsináptico.

blecidas en cuellos de espinas dendríticas comparadas con aquellas establecidas en cabezas de espinas dendríticas y tallos dendríticos, siendo las SA establecidas en cuellos de espinas dendríticas más pequeñas que las SA establecidas en cabezas o tallos dendríticos (ANOVA, $p < 0.001$; Tabla 13; Tablas suplementarias 24 y 25). En el caso de las SS, el número de las mismas no fue suficiente como para realizar un análisis estadístico robusto. Cuando se compararon los tamaños de las sinapsis en función de su elemento postsináptico entre ambos grupos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ni en las medias del área y perímetro de las sinapsis (t-test, $p > 0.001$) ni tampoco en las distribuciones de frecuencias de las mismas (KS, $p > 0.001$; Figura 41).

4.2.3. Capa III de la CE

En las muestras procedentes de la capa III de la CE de ambos grupos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de las SA establecidas en cabezas o cuellos de espinas dendríticas, o tallos dendríticos (ANOVA, KW, $p > 0.001$; Tabla 14; Tablas suplementarias 26 y 27). En el caso de las SS, el número de las mismas no fue suficiente como para realizar un análisis estadístico robusto. La comparación entre ambos grupos de los tamaños de las sinapsis en función del elemento postsináptico donde estaban establecidas no mostró diferencias estadísticamente significativas ni en las medias del área y perímetro de las sinapsis (t-test, MW, $p > 0.001$) ni tampoco en las distribuciones de frecuencias de las mismas (KS, $p > 0.001$; Figura 42).

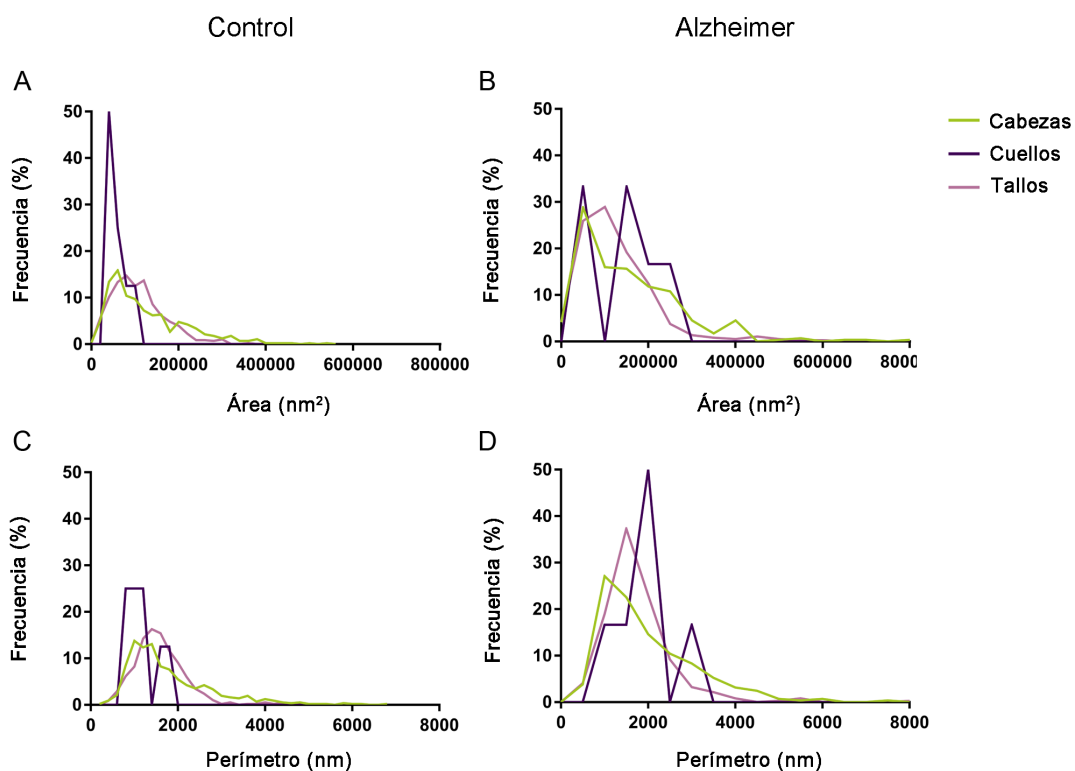


Figura 41. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa II de la CE en función del elemento postsináptico.

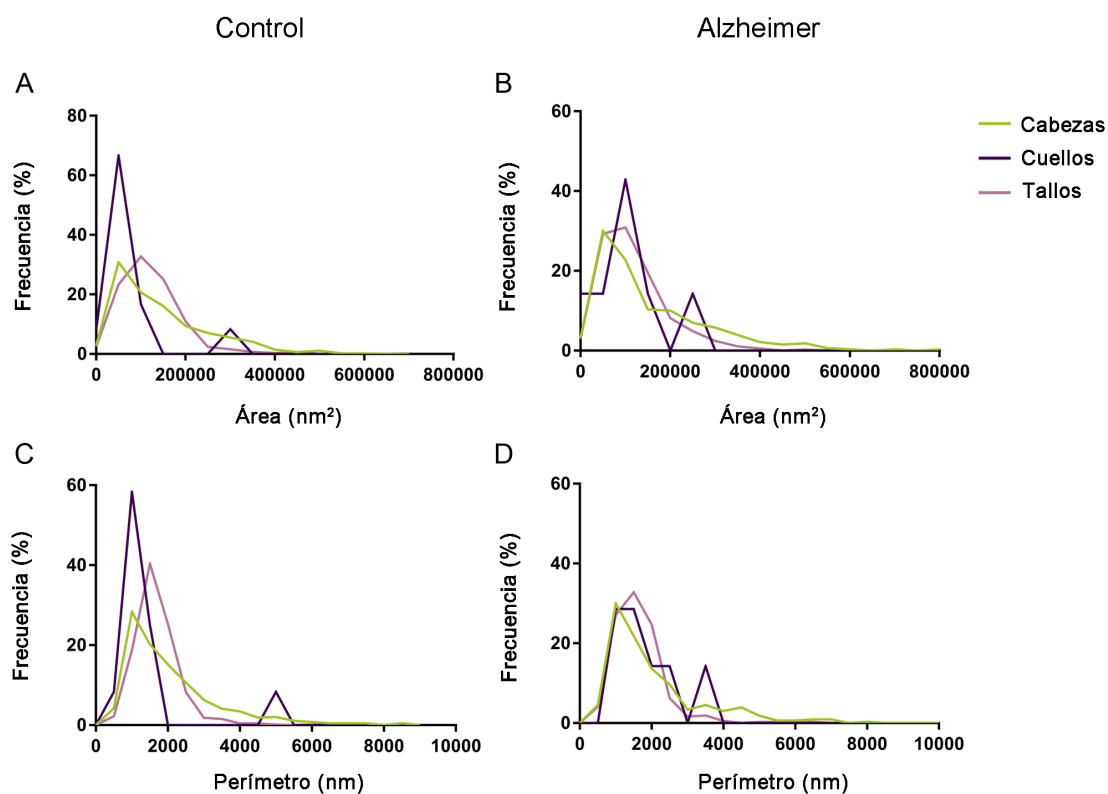


Figura 42. Gráficos de la distribución de frecuencias del área (A y B) y el perímetro (C y D) de la SAS de las SA en la capa III de la CE en función del elemento postsináptico.

V. DISCUSIÓN

1. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

En relación al estudio histopatológico, en el presente trabajo se analizó el grosor cortical de la CTE y la CE y se estudiaron los diferentes elementos corticales de la capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE, tanto en las muestras de sujetos control como en las muestras procedentes de pacientes con EA. El principal hallazgo del estudio histopatológico de la CTE fue una reducción significativa del grosor cortical, de aproximadamente un 35%, en las muestras procedentes de pacientes con EA. En el caso de la CE, los principales hallazgos del estudio histopatológico fueron un aumento significativo de la fracción de volumen cortical ocupado por células gliales en la capa II de la CE en las muestras procedentes de pacientes con EA y una reducción significativa en la fracción de volumen neuronal en la capa III de la CE en las muestras procedentes de pacientes con EA.

1.1. Cambios corticales relacionados con la enfermedad de Alzheimer: atrofia y pérdida neuronal

En primer lugar, en la capa II de la CTE no se encontraron diferencias significativas en la fracción de volumen cortical ocupado por somas neuronales, somas gliales y vasos sanguíneos entre el grupo control y el grupo con EA, aunque el volumen cortical ocupado por somas neuronales fue menor en el caso de las muestras procedentes de pacientes con EA (un 5.86%) en comparación con las muestras control (donde ese volumen fue de un 7.17%). Sin embargo, dado que se encontró una reducción del grosor

de la CTE de aproximadamente un 35% en las muestras de pacientes con EA, cabría esperar que el número de neuronas absoluto en dichas muestras fuese aún menor del encontrado. En el caso de la CE, tanto en la capa II como en la capa III de las muestras procedentes de pacientes con EA se encontró una disminución de la fracción de volumen cortical ocupado por neuronas, siendo esta reducción significativa en el caso de la capa III (Tabla 4). En el caso de la capa II de la CE el rango de fracción de volumen cortical ocupado por neuronas en las muestras control varía desde 2.23% hasta 8.67%, encontrándose una gran variabilidad en los datos (Tabla suplementaria 2). Esta variabilidad encontrada en los datos podría ser debida a las particularidades citoarquitectónicas de esta capa. Tal y como se comentó en la introducción, la capa II de la CE está constituida por células piramidales modificadas y células estrelladas que se agrupan formando lo que se denominan islas de células. Dichas islas, no presentan la misma apariencia a lo largo de la extensión rostro-caudal de la CE, de forma que en niveles rostrales y mediales los grupos de células son más elongados. Además, lateralmente a nivel rostral, la distancia entre las islas de células es menor, presentando una apariencia de estrato continuo que no es tan característica medialmente. Así, las diferencias en tamaño y distancia entre las islas de células podrían influir a la hora de realizar la estimación de la fracción de volumen cortical ocupado por neuronas en la capa II de la CE.

Los resultados de disminución neuronal encontrados en ambas regiones coinciden con otros estudios que han reportado pérdida neuronal en muestras procedentes de pa-

cientes con EA en la CE (siendo esta disminución más pronunciada en las capas II y IV), así como en otras regiones de la formación del hipocampo, como CA1 (Gómez-Isla *et al.*, 1996; Price *et al.*, 2001; Šimić *et al.*, 1997; Van Hoesen y Hyman, 1990). Junto a la pérdida neuronal, se ha observado una reducción del grosor de diferentes regiones corticales en pacientes con EA, como en la corteza frontal, en las áreas 21 y 22 de Brodmann o en la capa molecular del GD (Scheff y Price, 1993, 1998; Scheff *et al.*, 1990, 1996), así como una atrofia a nivel macroscópico de la CE (Van Hoesen *et al.*, 1991). Esta atrofia cortical, y, principalmente la pérdida neuronal en la CE de pacientes con EA, ha sido relacionada con la presencia de NTFs y placas de péptido A β , encontrándose una relación inversamente proporcional entre el número de neuronas y el grado de neuropatología (Gómez-Isla *et al.*, 1996; Van Hoesen *et al.*, 1991). Dado que las neuronas de proyección de la capa II/III de la CE constituyen el elemento fundamental de la vía perforante hacia la región CA1 del hipocampo, la pérdida neuronal en esta región, junto con la de otras regiones afectadas en los pacientes con EA, ha sido relacionada con los problemas de memoria característicos de los pacientes con EA (Andrade-Moraes *et al.*, 2013; Gunten *et al.*, 2006; Hyman *et al.*, 1986; Van Hoesen *et al.*, 1991).

2. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DEL NEUROPILO

Para el estudio ultraestructural del neuropilo de la capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE se identificaron un total de 13844

sinapsis. De esa muestra, se visualizaron y reconstruyeron en 3D un total de 10322 sinapsis, de las que se estimó la densidad sináptica en cada una de las capas, la proporción de SA y SS, así como su distribución espacial. Complementariamente, se calculó el volumen de neuropilo ocupado por las mitocondrias. El principal hallazgo del análisis ultraestructural del neuropilo fue una disminución significativa de la densidad sináptica en las capas II y III de la CE en las muestras procedentes de pacientes con EA.

2.1. Cambios sinápticos relacionados con la enfermedad de Alzheimer

El análisis ultraestructural del neuropilo de la capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE mostró una disminución de la densidad sináptica en las muestras procedentes de pacientes con EA. Esta disminución sináptica no fue significativa en el caso de la capa II de la CTE, pero, dado que en esta región se encontró una disminución de aproximadamente un 35% del grosor cortical en las muestras de los pacientes con EA, se puede deducir que realmente se ha producido una disminución del número absoluto de sinapsis en dicha capa y región. En relación a las muestras procedentes de la CE, en ambas capas, la disminución de la densidad sináptica en el caso de las muestras procedentes de los pacientes con EA fue estadísticamente significativa. Tanto en modelos animales como en muestras de tejido cerebral procedentes de pacientes con EA, se ha descrito una disminución del número de sinapsis por volumen en la capa molecular del GD, en CA1, en la corteza temporal y el giro cingular, así como en otras regiones neocortica-

les (Alonso-Nanclares *et al.*, 2013; Scheff y Price, 1993, 1998, 2003, 2006; Scheff *et al.*, 1990, 1996, 2006, 2007, 2011, 2015). Sin embargo, otros estudios de microscopía óptica y electrónica han encontrado un aumento de la densidad sináptica en la neocorteza y el hipocampo en el modelo de ratón APP/PS1 (King y Arendash, 2002), o incluso no han encontrado cambios en la densidad sináptica de las capas III y V de la CE en muestras procedentes de pacientes con EA (Scheff *et al.*, 1993).

Estas discrepancias en los cambios sinápticos pueden deberse a las diferencias tanto de los modelos experimentales, como de las metodologías utilizadas. Por ejemplo, se ha descrito que cerca de las placas de péptido A β hay una reducción en el número de sinapsis (Dorostkar *et al.*, 2015), y la aparición de estas placas depende de diversos factores, como por ejemplo del modelo animal utilizado. Es decir, no todos los modelos animales producen los cambios histológicos que suceden en el curso de la EA en pacientes que desarrollan la enfermedad.

Por otro lado, gran parte de los estudios de estimación de densidad sináptica se realizan mediante estimaciones indirectas: bien en microscopía óptica contando *puncta* inmunoreactivos para diferentes marcadores sinápticos (Honer *et al.*, 1992; Masliah *et al.*, 1990), o bien mediante microscopía electrónica de transmisión convencional en secciones ultrafinas. Sin embargo, inferir las características 3D de las sinapsis analizadas en dos dimensiones puede no ser adecuado (DeFelipe *et al.*, 1999; Merchán-Pérez *et al.*, 2009). El microscopio FIB/SEM, utilizado en este estudio, es una excelente herramienta para estudiar la ultraestructura y las alteraciones de la organización sináptica en el

cerebro humano (Blazquez-Llorca *et al.*, 2013). Con esta metodología es posible realizar una reconstrucción 3D de las uniones sinápticas de un volumen de tejido determinado, pudiendo identificar y clasificar cada una de las sinapsis presentes en el volumen de tejido, obteniéndose datos mucho más precisos sobre densidad sináptica que los obtenidos aplicando otras metodologías. Por ello, los resultados del presente estudio que muestran una reducción en el número total de sinapsis en la capa II de la CTE y una disminución de la densidad sináptica en las capas II y III de la CE en los pacientes con EA se pueden considerar más fiables y robustos.

Aunque la pérdida neuronal producida principalmente en la formación del hipocampo y regiones adyacentes ha sido relacionada con los déficits cognitivos observados en los pacientes con EA, parece que, la pérdida sináptica es la característica que mejor correlaciona con el déficit cognitivo (Arendt, 2009; Dickson *et al.*, 1995; Masliah *et al.*, 2001; Selkoe, 2002; Sze *et al.*, 1997; Terry *et al.*, 1991). Esta pérdida sináptica se produciría en los primeros estadios de la enfermedad, afectando en primer lugar a las regiones subcorticales y las cortezas entorrinales (Braak y Braak, 1991; Braak y Del Tredici, 2012).

Tanto la proteína tau como el péptido A β ejercen funciones normales en las sinapsis, sin embargo, bajo condiciones patológicas, podrían tener efectos tóxicos tanto en el elemento pre como postsináptico, conduciendo a una pérdida sináptica y una disfunción en la liberación de neurotransmisores (Henstridge *et al.*, 2016; Rajmohan y Reddy, 2017; Spires-Jones y Hyman, 2014; Zhou *et al.*, 2017), características de la EA. Además,

tanto la proteína tau como el péptido A β en condiciones patológicas pueden producir alteraciones mitocondriales, alterando la dinámica y el transporte mitocondrial y, como consecuencia, produciéndose especies reactivas de oxígeno. Dado que las mitocondrias son críticas para proporcionar la energía demandada por las sinapsis, e intervienen en el mantenimiento de las concentraciones de calcio necesarias para la liberación del neurotransmisor, la disfunción mitocondrial podría afectar a la neurotransmisión y la actividad sináptica (Cai y Tammini, 2017; Tönnies y Trushina, 2017). Teniendo en cuenta esto último, en el presente estudio se valoró la posible alteración de las mitocondrias, para lo que se estimó el volumen de neuropilo que ocupaban, pero no se han encontrado diferencias entre el grupo control y el grupo con EA. Sin embargo, varios estudios han revelado alteraciones mitocondriales en el hipocampo en muestras procedentes de tejido humano de pacientes con EA y en modelos animales, tanto a nivel ultraestructural como en relación al funcionamiento mitocondrial (Choi *et al.*, 2014; Du *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2017; Hirai *et al.*, 2001; Moreira *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2016). Por ello, aunque no se observen cambios en la fracción de volumen mitocondrial en las muestras de pacientes con EA, es posible que se estén produciendo alteraciones y, consecuentemente, cambios en el funcionamiento mitocondrial en los pacientes con EA.

Finalmente, en este estudio se ha encontrado que la disminución de la densidad sináptica en las muestras procedentes de pacientes con EA afectó por igual a las SA y las SS, ya que no se observaron cambios en la proporción de SA y SS en ninguna de las dos

regiones estudiadas en las muestras de los pacientes con EA. El mantenimiento del balance de excitación/inhibición es fundamental para el correcto funcionamiento del sistema nervioso (Ascoli *et al.*, 2008), ya que ha sido propuesto que un desequilibrio en los circuitos excitadores e inhibidores puede ser el sustrato de ciertas enfermedades como la epilepsia (DeFelipe, 1999; Stafstrom, 2006). Dado que esta pérdida sináptica está afectando por igual a ambos tipos sinápticos, y la mayor parte de las sinapsis en la corteza cerebral son SA o sinapsis excitadoras, se puede afirmar que la principal disminución se debe a la pérdida de estas SA. Puesto que la mayoría de las sinapsis excitadoras se establecen en las cabezas de espinas dendríticas de neuronas piramidales (DeFelipe y Fariñas, 1992), se podría estar produciendo además una pérdida o desconexión de las espinas dendríticas en estas capas y regiones en la EA.

2.1.1. Variabilidad interindividual

A pesar de que en las muestras procedentes de los pacientes con EA se encontró una disminución de la densidad sináptica en las dos regiones estudiadas, destaca la gran variabilidad interindividual. Puesto que el tiempo *postmortem* fue similar y el procesamiento fue el mismo para todas ellas, descartamos la posibilidad de que la variabilidad de los datos se debiese a efectos metodológicos. Dado el efecto tóxico que tienen la agregación de la proteína tau y el péptido A β en la correcta funcionalidad de las sinapsis, cabría esperar una relación entre el grado de progresión de la enfermedad y la pérdida sináptica observada, de forma que cuanto mayor es el grado de

progresión mayor es la pérdida sináptica. Así, estadios de Braak/CERAD bajos (I-III/A) se relacionan con la presencia de NTFs solamente en la formación del hipocampo y cortezas entorrinales y con baja densidad de placas; mientras que estadios de Braak/CERAD altos (V-VI/C) se relacionan con NTFs ampliamente distribuidos en la formación del hipocampo, cortezas entorrinales y otras regiones de la neocorteza, y una alta densidad de placas neuríticas. En este sentido, el sujeto que presentó una mayor atrofia cortical y un grado más elevado de neuropatología y progresión de la enfermedad (el paciente VK16, con diagnóstico Braak/CERAD: VI/C) presentó la menor densidad sináptica, tanto en la capa II como en la capa III de la CE (no se disponen de los datos de la CTE), observándose una densidad sináptica muy baja ($0.12 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$). Igualmente, el sujeto VK22, clasificado como estadio de Braak/CERAD de V/C, presentaba también una densidad sináptica baja en la CTE ($0.16 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$). Sin embargo, se encontró que el sujeto IF2, aun teniendo el mismo grado de diagnóstico neuropatológico que el sujeto VK22 (Braak/CERAD: V/C en ambos casos), presentaba una densidad sináptica de casi el doble ($0.40 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$). A pesar de estas diferencias en la densidad sináptica, todos estos sujetos estaban diagnosticados de demencia, por lo que habría otros factores implicados en su desarrollo, además del grado neuropatológico y la densidad sináptica.

Se ha propuesto el concepto de “reserva cognitiva”, que podría justificar la disyunción entre el grado de patología y su manifestación clínica (Stern, 2002). Brevemente, se postula que las diferencias individuales

en el procesamiento de la información permiten, a algunos individuos, lidiar mejor con los cambios cerebrales producidos en las enfermedades neurodegenerativas, incluidas la EA (Stern, 2006, 2009). En relación a esto, el sujeto IF1, a pesar de presentar una densidad sináptica en la CTE relativamente baja ($0.33 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$) no presentaba evidencia de demencia. Sin embargo, en este caso, el grosor cortical presentado por este sujeto en la CTE fue superior al grosor de dicha corteza presentado por los sujetos diagnosticados de demencia. Hay que tener en cuenta que las características histopatológicas típicas de la EA (al menos en los primeros estadios que afecta a la CTE y la CE) también se observan en torno a un 80% de los individuos mayores de 65 años, pero la demencia solamente se presenta en un porcentaje pequeño en esa edad (esta prevalencia de demencia aumenta en torno a un 25% en individuos de 80 años; Ferrer, 2012). Por tanto, IF1 podría ser un caso de pre-demencia (prodromal; Ferrer, 2012), o tal vez, nunca habría llegado a desarrollarla. El análisis del grupo control también mostró variabilidad interindividual, siendo mayor en el caso de la CTE que en la CE. Otros estudios han reportado variabilidad en la densidad sináptica en la corteza temporal humana, en función del sexo (de 0.72 a $1.06 \text{ sinapsis}/\mu\text{m}^3$; Alonso-Nanclares *et al.*, 2008), así como cambios entre diferentes regiones corticales, relacionadas con la edad en el macaco (Peters y Kemper, 2012). Por lo tanto, factores como el sexo o la edad de los sujetos de estudio podrían estar influyendo en la variabilidad sináptica encontrada.

2.2. Distribución sináptica espacial tridimensional

Las sinapsis, al igual que cualquier objeto en un espacio 3D, pueden distribuirse de acuerdo a 3 tipos de patrones: (a) aleatorio, donde cada una de las sinapsis tiene la misma probabilidad de ocupar una posición en el espacio que otra; (b) regular, donde cada una de las sinapsis se distribuye lo más lejos posible de sus sinapsis vecinas; y (c) en grupo, donde las sinapsis tienden a agruparse. Cuando se lleva a cabo una modelización de la distribución espacial de las sinapsis hay que tener en cuenta que las sinapsis son objetos independientes que no se pueden solapar, y, por lo tanto, la distancia mínima entre dos sinapsis viene condicionada por el tamaño de las mismas (Merchán-Pérez *et al.*, 2014).

En este estudio, la distribución espacial 3D de las sinapsis, en todas las capas y regiones analizadas, se ajustó a un modelo de distribución espacial aleatorio, tanto en las muestras de los sujetos control como en las de los sujetos con EA. Estudios previos realizados en el neuropilo libre de placas de pacientes con EA, en la capa molecular del GD del modelo animal APP/PS1, y en la corteza somatosensorial de la rata también mostraron un patrón de distribución aleatorio de las sinapsis (Alonso-Nanclares *et al.*, 2013; Blazquez-Llorca *et al.*, 2013; Merchán-Pérez *et al.*, 2014). Por tanto, las sinapsis presentan un patrón de distribución espacial 3D aleatorio que no parece estar afectado por la EA y es común entre diferentes regiones y especies.

Además del análisis del patrón de distribución espacial 3D, se evaluó la distancia de cada sinapsis a la sinapsis más cercana, de-

nominada “distancia al vecino más cercano”. Cuando se evaluaron estas diferencias, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, a pesar de que en ambas regiones dicha distancia fue ligeramente mayor en el grupo de pacientes con EA. En concreto, los pacientes que presentan la menor densidad sináptica, presentaban una distancia al vecino más cercano mayor en comparación con la media del grupo (por ejemplo, en el caso de VK16, que presentó una densidad sináptica muy baja en la capa III de la CE, la distancia al vecino más cercano fue 1275nm, siendo la media del grupo 970nm; Tabla 5 y Tablas suplementarias 4, 5 y 6). Por lo tanto, los mayores valores de distancia al vecino más cercano se corresponderían con las densidades sinápticas más bajas. La disminución del grosor cortical encontrada en la CTE y la CE, implicaría una reducción de la distancia al vecino más cercano entre las sinapsis. Así, el aumento de la distancia al vecino más cercano encontrado en las muestras de pacientes con EA, y, concretamente, en los pacientes con menor densidad sináptica, implica que se está produciendo una pérdida sináptica real en ambas regiones.

3. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LAS SINAPSIS

En el estudio ultraestructural de las características morfológicas de las sinapsis se utilizó un nuevo método para la estimación del tamaño de las mismas que consiste en la extracción de su SAS. Además, la visualización 3D de las sinapsis permitió establecer con claridad su morfología: macular,

perforada, herradura o fragmentada. Los principales hallazgos del análisis ultraestructural de las características morfológicas de las sinapsis fueron: (I) tanto en la capa II de la CTE como en las capas II y III de la CE las SA fueron más grandes que las SS; (II) en ambas regiones, la mayoría de las sinapsis presentaron una morfología macular, siendo éstas más pequeñas que las sinapsis perforadas, en herradura y fragmentadas; (III) en la capa II de la CTE de las muestras procedentes de pacientes con EA se encontró un aumento de las SA con morfología fragmentada; (IV) en las muestras de la capa III de la CE procedentes de pacientes con EA se encontró un aumento de las SA con morfología macular y fragmentada y una disminución de las SA con morfología perforada.

3.1. Tamaño sináptico: superficie sináptica de aposición

Tanto en la capa II de la CTE como en las capas II y III de la CE no se encontraron diferencias ni en el área ni el perímetro de la SAS de las sinapsis en el grupo de pacientes con EA. Además, en todos los casos, se encontró que las SA fueron más grandes que las SS. Aunque varios estudios realizados con muestras de tejido humano y modelos animales han reportado un incremento de la longitud de aposición sináptica como posible mecanismo compensatorio ante la pérdida sináptica producida en la EA (Alonso-Nanclares *et al.*, 2013; Scheff y Price, 1993, 1998, 2006; Scheff *et al.*, 1990, 1993, 1996), nuestros resultados no apoyan estos cambios en la longitud de aposición sináptica en pacientes con EA. Es importante recalcar que en el presente estudio se ha

medido la SAS, en vez de la longitud de aposición sináptica que es una estimación basada en secciones individuales de microscopia electrónica. Esta medida de la SAS ofrece varias ventajas en comparación con los otros métodos. En primer lugar, la SAS se extrae de forma automática de la unión sináptica previamente segmentada, por lo que no requiere la manipulación del usuario y evita así el posible sesgo asociado a dicha manipulación (Morales *et al.*, 2013). En segundo lugar, a pesar de ser una superficie, es un objeto en 3D que se adapta y reproduce la forma y curvatura de la PSD. Finalmente, de la SAS se puede extraer datos de área y perímetro, obteniéndose información concisa del tamaño de las uniones sinápticas. Por lo tanto, el análisis del área y el perímetro de la SAS de más de 10000 sinapsis realizado en este estudio evidencia que no hay cambios en el tamaño de la SAS de las uniones sinápticas de la capa II de la CTE y de las capas II y III de la CE en las muestras procedentes de los pacientes con EA.

3.2. Morfología sináptica

3.2.1. Forma y tamaño de las sinapsis

Las sinapsis son estructuras dinámicas que pueden sufrir modificaciones debido a su actividad, y están sometidas a procesos de remodelación continuos (Peters *et al.*, 1991). La forma y el tamaño de las sinapsis están relacionados con la probabilidad de liberación del neurotransmisor, la fuerza y eficacia sináptica, y con fenómenos de plasticidad (Biederer *et al.*, 2017; Ganeshina *et al.*, 2004a; Holderith *et al.*, 2012; Südhof, 2012; Takumi *et al.*, 1999; Tarusawa *et al.*, 2009).

Como ya se ha descrito, en este estudio, tanto en las muestras control como en las procedentes de sujetos con EA, las sinapsis han sido clasificadas en 4 categorías según su morfología: sinapsis maculares (con una PSD continua), sinapsis perforadas (con una PSD con uno o más agujeros), sinapsis en herraduras (con una PSD con un perímetro que tiene una hendidura en forma de herradura) y sinapsis fragmentadas (con dos o más PSDs separadas; Figura 10). En general, tanto en las muestras de la capa II de la CTE como en las muestras de las capas II y III de la CE, la mayoría de las sinapsis (tanto SA como SS) presentaron una morfología macular, y en menor proporción morfología perforada y en herradura. Las sinapsis con morfología fragmentada fueron muy poco frecuentes (Tabla 7). Teniendo en cuenta el tamaño de las sinapsis en función de la morfología presentada, las sinapsis maculares fueron mucho más pequeñas que las sinapsis con morfología perforada, en herradura o fragmentada.

Dada la perspectiva únicamente anatómica del presente estudio, no podemos saber cómo afectan los cambios morfológicos a la función sináptica. Sin embargo, varios estudios han relacionado un aumento en la complejidad sináptica (con morfologías no maculares) con un incremento en la eficiencia de la transmisión sináptica, mediante la inserción de nuevos receptores en la membrana postsináptica (Lüscher *et al.*, 2000). Dicha incorporación de nuevos receptores podría producirse bien por vía endosomal, o bien, por difusión lateral desde la zona de la membrana extra-sináptica (Kneussel y Hausrat, 2016). En condiciones normales, las sinapsis maculares tienen la capacidad de aumentar su perímetro progresivamen-

te, adoptando un perímetro más tortuoso con perforaciones y hendiduras (Geinisman *et al.*, 1987, 1991, 1992a y b). Por lo tanto, las sinapsis pueden llegar a ser más grandes y complejas mediante un proceso de remodelación que incluye la inserción de nuevos receptores en la membrana postsináptica. Algunos estudios han encontrado un incremento en la inmunoreactividad para receptores de glutamato (AMPA y NMDA) en sinapsis perforadas en comparación con sinapsis no perforadas (Ganeshina *et al.*, 2004a y b). Además, los modelos que estudian la relación entre el tamaño de las uniones sinápticas y la probabilidad de liberación de neurotransmisor, o la densidad de receptores AMPA, sugieren que las sinapsis más grandes (con un mayor número de receptores postsinápticos) podrían producir respuestas sinápticas más potentes y homogéneas, mientras que las sinapsis más pequeñas (con un menor número de receptores) producirían respuestas más débiles y variables (Montes *et al.*, 2015).

Adicionalmente, se ha propuesto que las sinapsis fragmentadas son sinapsis especializadas que podrían producir una respuesta sináptica mayor comparada con las sinapsis con una única PSD (Geinisman *et al.*, 1987; Ganeshina *et al.*, 2004b). Varios estudios han descrito en las regiones del GD y CA1 del hipocampo de la rata un incremento en el número de sinapsis fragmentadas como resultado de la remodelación de las sinapsis tras una estimulación repetida o una potenciación a largo plazo (Geinisman *et al.*, 1991, 1992a y b, 1993; Toni *et al.*, 2001). Durante este proceso de remodelación, una sinapsis con una PSD continua en forma de disco (macular) incrementaría su tamaño mediante la formación de uno o más agujeros

ros, llegando a desarrollar un perímetro con una hendidura en forma en herradura hasta finalmente separarse en dos PSD sin continuidad entre ellas (Geinisman *et al.*, 1987). Así, se podría postular que las sinapsis fragmentadas podrían constituir un estadio estructural final, evolucionando desde una morfología perforada y/o en herradura para constituir un contacto sináptico especializado con una eficacia sináptica inusualmente alta. Aunque el porcentaje de sinapsis perforadas, en herradura y fragmentadas es relativamente bajo en comparación con las sinapsis con morfología macular, hay que tener en cuenta que tanto en la CTE como en la CE hay billones de sinapsis, por lo que el ratio de dinamismo sináptico y, por tanto, el cambio a morfologías más complejas de mayor eficacia sináptica podría ser relativamente alto.

En relación al tamaño y morfología de las sinapsis, en todas las muestras analizadas (en ambos grupos) las sinapsis con morfología macular fueron más pequeñas que las sinapsis perforadas, en herradura o fragmentadas. Si se atiende a la composición molecular de la PSD, ha sido descrito que las sinapsis más grandes tienen mayor número de receptores AMPA, mientras que sinapsis más pequeñas presentan una mayor concentración de receptores NMDA (Kharazia y Weinberg, 1999). En este estudio, no se han encontrado cambios en el tamaño de las sinapsis entre el grupo control y el grupo con EA en ninguna de las regiones analizadas, sin embargo, dada la enorme complejidad en la composición de proteínas de las sinapsis humanas (Grant, 2012), no podemos descartar cambios en su composición y número de receptores postsinápticos en los pacientes con EA.

3.2.2. Cambios de morfología sináptica en la enfermedad de Alzheimer

Como se ha mencionado anteriormente, en todas las muestras procedentes de pacientes con EA la mayoría de las sinapsis presentaron una morfología macular, y las sinapsis perforadas, en herradura y fragmentadas fueron menos frecuentes. Sin embargo, se encontraron cambios en la morfología de la sinapsis cuando se compararon con las muestras de los sujetos control. Concretamente, en la capa II de la CTE se encontró un incremento de SA con morfología fragmentada; y en la capa III de la CE se encontró un aumento de SA con morfología fragmentada y macular, así como una disminución de SA con morfología perforada.

El incremento en el número de sinapsis con morfología fragmentada ha sido relacionado con la potenciación de la eficacia sináptica (Geinisman *et al.*, 1991, 1992a y b, 1993; Toni *et al.*, 2001), por tanto, los cambios morfológicos encontrados en las muestras de los pacientes con EA podrían estar relacionados con la activación de mecanismos compensatorios en respuesta a la pérdida sináptica. Recientemente, se ha propuesto un aumento de la actividad sináptica durante las fases tempranas de la EA como respuesta compensatoria en el desarrollo de la enfermedad (Tampellini, 2015). Si la potenciación de la actividad sináptica conduce a un incremento en la proporción de sinapsis con morfología más compleja o fragmentadas, entonces se podría hipotetizar que los cambios morfológicos producidos en la EA, y más concretamente el aumento en el número de sinapsis fragmentadas, podrían deberse a la puesta en marcha de mecanis-

mos compensatorios durante el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, puede ser que este tipo de mecanismo compensatorio falle o no sea suficiente, y que al final igualmente la actividad sináptica decaiga con la progresión de la enfermedad. Además, hay que tener en cuenta que un incremento en el número de sinapsis con morfología fragmentada conlleva la formación de varios sitios de liberación de neurotransmisor, lo que en el caso del aumento de las sinapsis excitadoras fragmentadas podría resultar en un incremento en la liberación de glutamato y con ello promoverse neurotoxicidad o muerte neuronal (Anaya-Martínez *et al.*, 2014). Otra posibilidad es que las sinapsis fragmentadas sean más resistentes a la degeneración y que al disminuir los otros tipos de sinapsis se produciría un incremento en la proporción de este tipo de sinapsis.

4. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS SINAPSIS EN EL NEUROPILO

La utilización de una herramienta de obtención y visualización 3D de las muestras de tejido de la CTE y la CE humana nos ha permitido la navegación y visualización a través de las series de imágenes, pudiéndose así establecer los elementos postsinápticos donde estaban establecidas cada una de las sinapsis identificadas en la muestra. En relación al estudio de la distribución de las sinapsis en el neuropilo los principales hallazgos fueron los siguientes: (I) en la capa II de la CTE y en las capas II y III de la CE las SA presentaron preferencia por establecerse en las cabezas de las espinas dendríticas, mientras que las SS presentaron esa preferencia por los tallos dendríticos; (II) en la

capa II de la CTE de las muestras procedentes de pacientes con EA se encontró una disminución de la SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas y un aumento del número de SA establecidas en tallos dendríticos.

4.1. Proporción y frecuencia de las sinapsis en los elementos postsinápticos

Los análisis sobre la determinación de los elementos postsinápticos mostraron que las SA presentaban preferencia por establecerse en las cabezas de las espinas dendríticas, mientras que las SS mostraban preferencia por establecerse en los tallos dendríticos. Cuando se tuvo en cuenta tanto el tipo de sinapsis (SA o SS) como el tipo de elemento postsináptico donde estaba establecida (cabeza o cuello de espina dendrítica, o tallo dendrítico), se encontró que en el caso de la capa II de la CTE la mayoría de las sinapsis fueron SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas, seguidas de SA establecidas en tallos dendríticos, SS establecidas en tallos dendríticos y SS en cabezas de espinas dendríticas. Tanto las SA como las SS establecidas en cuellos de espinas dendríticas fueron muy poco frecuentes. En el caso de las capas II y III de la CE, la distribución fue la misma, a excepción de que en este caso la combinación más frecuente fue la de SA establecidas en tallos dendríticos, seguida de SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas (Figura 37). Otros estudios de microscopía electrónica realizados en la corteza estriada y corteza prefrontal del mono, la corteza visual y frontal del ratón y la corteza de los barriles de la rata

	CTE Humana	CE Humana		Corteza estriada (área 17) del mono ¹		Corteza visual del gato ²		Corteza somato- sensorial de la rata ³
	Capa II	Capa II	Capa III	Capas II-III	Todas las capas	Capa II	Todas las capas	Todas las capas
SA en espinas	55.2%	44.9%	43.8%	54.9%	53.0%	71.2%	66.4%	73.0%
SA en tallos dendríticos	37.4%	45.4%	48.1%	27.7%	30.0%	13.3%	17.6%	12.9%
SS tallos dendríticos	6.8%	8.5%	6.8%	11.4%	11.9%	10.8%	10.6%	9.3%
SS en espinas	0.6%	1.2%	1.3%	6.0%	5.1%	4.7%	5.3%	4.8%

Tabla 15. Resumen comparativo sobre el patrón de distribución sináptica en los diferentes elementos post-sinápticos obtenido en el presente estudio y en diversas especies y regiones corticales. Los datos están expresados en forma de porcentaje. Los datos han sido obtenidos de: ¹Beaulieu *et al.*, (1992); ²Beaulieu y Colonnier (1985); ³Micheva y Beaulieu (1996).

han descrito un patrón parecido: la combinación más frecuente encontrada fue la de SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas (con un rango de 43.8% en la CE humana a 73.0% en la corteza somatosensorial de la rata) y SA establecidas en tallos dendríticos (con un rango de 12.9% en la corteza somatosensorial de la rata a 48.1% en la CE humana), seguidas de SS establecidas en tallos dendríticos (6.8% en la CTE y CE humana - 11.9% en la corteza estriada del mono) y, finalmente, SS establecidas en cabezas de espinas dendríticas (0.6% en la CTE humana- 6.0% en la corteza estriada del mono; Beaulieu y Colonnier, 1985; Beaulieu *et al.*, 1992; Hsu *et al.*, 2017; Micheva y Beaulieu, 1996; Tabla 15).

Teniendo en cuenta las diferencias estructurales y funcionales entre regiones cerebrales y especies diferentes (DeFelipe, 2011), la similitud de los patrones de distribución en los diferentes elementos post-sinápticos es notable. Igualmente, aunque las combinaciones presenten semejanza en cuanto a su frecuencia, si atendemos a los porcentajes concretos de cada una de las combinaciones hay ciertas diferencias importantes (Tabla 15). Por ejemplo, en el caso de la combinación más frecuentes de SA establecidas en espinas dendríticas, la proporción es similar en el caso de la CTE y CE humana y la corteza estriada del mono (encontrándose unos porcentajes cercanos al 50.0%, con un rango de entre un 43.8% y

un 55.2%); mientras que difieren en comparación con la corteza visual del gato y el mono, y la corteza frontal del ratón y somatosensorial de la rata (donde el porcentaje de SA establecidas en espinas dendríticas es mayor y se encuentra en torno al 70.0%, con un rango de entre 66.4%-94%). Cabe destacar que tanto la CTE como la CE en el caso de la especie humana muestran un gran parecido en cuanto al porcentaje de cada uno de los elementos postsinápticos, encontrando casi la mitad de las sinapsis establecidas en espinas dendríticas y la mitad en tallos dendríticos, cuando la mayoría de los estudios indican que la mayor parte de las SA se establecen en las espinas dendríticas. Estas diferencias entre regiones corticales y especies animales podrían ser atribuidas a la especialización de cada una de las áreas analizadas. Igualmente, no se puede descartar que las diferencias encontradas entre los diferentes estudios puedan ser debidas a las metodologías utilizadas, como puede ser, por ejemplo, diferencias en la identificación y conteo de los elementos postsinápticos en microscopia eléctrica en dos dimensiones *versus* 3D.

4.2. Reorganización de los elementos postsinápticos en la enfermedad de Alzheimer

En los pacientes con EA, la distribución de las sinapsis en los diferentes elementos postsinápticos mostró los mismos resultados que en el grupo control: las SA tenían preferencia por las cabezas de las espinas dendríticas; mientras que las SS mostraban preferencia por los tallos dendríticos. Cuando se atendió al tipo de sinapsis (SA o SS) y al tipo de elementos postsináptico en el

que estaba establecida, las combinaciones en cada una de las regiones fueron las mismas que en las muestras control, siendo las combinaciones más frecuentemente encontradas las de SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas y en tallos dendríticos (Figura 37).

Teniendo en cuenta que el volumen de la cabeza de las espinas dendríticas ha sido relacionado con el tamaño de la PSD (lo cual a su vez se ha relacionado con el número de receptores de la PSD; Nusser *et al.*, 1998) y con la probabilidad de liberación del neurotransmisor (Arellano *et al.*, 2007a; Montes *et al.*, 2015); el número y la morfología de las espinas dendríticas es fundamental desde un punto de vista funcional (Yuste, 2010; Herms y Dorostkar, 2016). Así, cuando se analizó la distribución de las sinapsis en los elementos postsinápticos, se encontró que en la capa II de la CTE de las muestras del grupo con EA había una disminución significativa del número de SA establecidas en las cabezas de las espinas dendríticas. Estos resultados coinciden con lo descrito en otros estudios que muestran, no solamente una reducción en el número, sino también cambios en la morfología de las espinas dendríticas en la EA. Concretamente, se han descrito, en la corteza cerebral de modelos animales y pacientes con EA, cambios morfológicos y disminución de las espinas dendríticas cerca de las placas de péptido A β (Knafo *et al.*, 2009; Llorens-Martín *et al.*, 2014; Merino-Serrais *et al.*, 2011; Pozueta *et al.*, 2013; Spires-Jones *et al.*, 2007; Tackenberg *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 2015). Otros estudios han relacionado cambios morfológicos y pérdida de espinas dendríticas con la presencia de proteína tau (en forma de pre-ovillos o NTFs) en neuro-

nas piramidales, tanto en modelos animales como en pacientes con EA (Merino-Serrais *et al.*, 2013; Pozueta *et al.*, 2013; Tackenberg *et al.*, 2009). Por lo tanto, tanto la presencia de NTFs como de placas de péptido A β en el neuropilo, pueden inducir alteraciones de las espinas dendríticas.

Se encontró una gran variabilidad interindividual dentro del grupo de sujetos con EA en las SA en espinas dendríticas. Así, los dos sujetos que presentaron un estadio de la EA correspondiente a un menor grado de desarrollo de la enfermedad (IF6 y VK11, con estadios de Braak/CERAD: III-IV/A) mostraron valores de SA en cabezas de espinas dendríticas similares a los encontrados en el grupo control; mientras que los sujetos con mayor grado de EA (VK16 y VK22, con estadios de Braak/CERAD: V/C) fueron los que presentaron el menor valor de SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas. Por lo tanto, se podría decir que el grado de progresión y desarrollo de la EA podría influir en el número de sinapsis establecidas en espinas dendríticas. Sin embargo, el sujeto IF1, que tiene un estadio de Braak/CERAD IV/B presentó, tanto en la CTE como en la CE, valores de sinapsis en espinas dendríticas similares a los encontrados en el grupo control, por lo que debe haber otros factores además del grado de progresión de la enfermedad que podrían estar influyendo en el número de sinapsis establecidas en espinas. En particular, en el caso de IF1, no se describieron problemas cognitivos, pudiendo ser un caso de EA pródromo o de pre-demencia con poca pérdida de espinas dendríticas. En este sentido, dado que la mayor parte de las sinapsis que recibe una neurona piramidal se establecen en las espinas dendríticas, y representan la mayoría

de las SA (DeFelipe y Farinas, 1992), la pérdida de espinas y, por tanto, la pérdida de sinapsis, podría proponerse como sustrato estructural de la patogénesis encontrada en la EA, así como de otras enfermedades neurodegenerativas (Herms y Dorostkar, 2016). Para concluir, en el caso de las capas II y III de la CE, se encontró una ligera disminución de las SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas, pero no fue significativa. En este caso, aunque puede que se haya producido una ligera pérdida de espinas dendríticas, podrían estar produciéndose otros procesos de reorganización de los elementos postsinápticos, como, por ejemplo, una reorganización de las sinapsis axoaxónicas o axodendríticas. Además, parte de las espinas dendríticas podrían tornarse no funcionales (Llorens-Martín *et al.*, 2014; Merino-Serrais *et al.*, 2013), por lo que podrían estar produciéndose otros cambios de reorganización, no solamente la pérdida de espinas dendríticas en las capas II y III de la CE en los pacientes con EA.

5. COMENTARIOS FINALES

En el presente estudio, se ha podido obtener la muestra más completa realizada hasta la fecha sobre sinapsis en la CTE y la CE del cerebro humano, con más de 10000 uniones sinápticas reconstruidas en 3D, tanto en condiciones normales como en muestras procedentes de pacientes con EA. En dichas muestras, se ha podido identificar y determinar con precisión el tipo de sinapsis, su morfología, el elemento postsináptico donde estaba establecida, así como su distribución espacial 3D. Además, se ha realizado un estudio comparativo entre las muestras procedentes de sujetos control y

las muestras procedentes de pacientes con EA, pudiendo determinar las posibles alteraciones sinápticas relacionadas con el desarrollo de dicha enfermedad. En las muestras procedentes de los sujetos con EA se ha encontrado pérdida sináptica, cambios en la morfología de las sinapsis y una reorganización de los elementos postsinápticos. Aun así, y a pesar de la robustez de la metodología empleada en el estudio y del

gran número de sinapsis analizadas, hay que tener en cuenta que los datos proceden del análisis de 6 casos control y 6 casos de EA, en cada una de las capas de las regiones analizadas. Además, hay que tener en cuenta que, dado que la microestructura cortical es característica de cada región cortical (DeFelipe, 2011), estos datos no son extrapolables a otras regiones corticales ni a otras especies.

VI. CONCLUSIONES

1. Estudio histopatológico de la CTE y la CE

- 1.1. En las muestras de CTE de los pacientes con EA se encontró una reducción del grosor cortical de aproximadamente un 35%.
- 1.2. En las muestras de la capa II de la CE procedentes de pacientes con EA se encontró un aumento de la fracción de volumen cortical ocupada por células gliales.
- 1.3. En las muestras de la capa III de la CE procedentes de los pacientes con EA se encontró una reducción de la fracción de volumen cortical ocupada por neuronas.

2. Estudio ultraestructural de las sinapsis en el neuropilo

- 2.1. En las muestras de las capas II y III de la CE procedentes de pacientes con EA se encontró una disminución significativa de la densidad sináptica.
- 2.2. Tanto en la capa II de la CTE como en las capas II y III de la CE las SA superaron en proporción a las SS.

3. Estudio ultraestructural de las características morfológicas de las sinapsis

- 3.1. En ambas regiones, las SA fueron más grandes que las SS.
- 3.2. En todas las capas analizadas, la mayoría de las sinapsis (más del 65-80%) presentaron una morfología macular. Sin embargo, diferenciando por categoría morfológica, las SS presentaron preferencia por una morfología en forma de herradura.
- 3.3. Tanto en la CTE como en la CE las sinapsis con morfología macular fueron más pequeñas que las sinapsis perforadas, en herradura y fragmentadas.
- 3.4. En las muestras de la capa II de la CTE procedentes de pacientes con EA se encontró un aumento del número de SA con morfología fragmentada.
- 3.5. En las muestras de la capa III de la CE procedentes de pacientes con EA se encontró un aumento del número de SA con morfología macular y fragmentada y una disminución en el número de SA con morfología perforada.

4. Estudio de la proporción y frecuencia de las sinapsis en el neuropilo

- 4.1. Las SA presentaron preferencia por establecerse en las cabezas de las espinas dendríticas, mientras que las SS presentaron esa preferencia por los tallos dendríticos.
- 4.2. En las muestras de la capa II de la CTE procedentes de pacientes con EA se encontró una disminución en el número de SA establecidas en cabezas de espinas dendríticas y un aumento del número de SA establecidas en tallos dendríticos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Rodríguez JR, DeFelipe J (2008) Gender differences in human cortical synaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14615–14619.
- Alonso-Nanclares L, Merino-Serrais P, González S, DeFelipe J (2013) Synaptic Changes in the Dentate Gyrus of APP/PS1 Transgenic Mice Revealed by Electron Microscopy. *J Neuropathol Exp Neurol* 72: 386–395.
- Alzheimer's Association (2019) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 15: 321–387.
- Anaya-Martínez V, Gutierrez-Valdez AL, Ordoñez-Librado JL, Montiel-Flores E, Sánchez-Betancourt J, Sánchez Vázquez del Mercado C et al (2014) The presence of perforated synapses in the striatum after dopamine depletion, is this a sign of maladaptive brain plasticity? *Microscopy (Oxf)* 63: 427–435.
- Andrade-Moraes CH, Oliveira-Pinto AV, Castro-Fonseca E, da Silva CG, Guimarães DM, Szczupak D et al (2013) Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *Brain* 136: 3738–52.
- Arellano JI, Benavides-Piccione R, DeFelipe J, Yuste R (2007a) Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Neurosci* 1: 131–143.
- Arellano JI, Espinosa A, Fairén A, Yuste R, DeFelipe J (2007b) Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neurosci* 145: 464–469.
- Arendt T (2009) Synaptic degeneration in AD. *Acta Neuropathol* 118: 167–179.
- Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, et al (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9: 557–568.
- Augustinack JC, Huber KE, Stevens AA, Roy M, Frosch MP, van der Kouwe AJW et al (2013) Predicting the location of human perirhinal cortex, Brodmann's area 35, from MRI. *NeuroImage* 64: 32–42.
- Bartsch T, Wulff P (2015) The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neurosci* 309: 1–16.
- Beaulieu C, Colonnier M (1985) A laminar analysis of the number of round-asymmetrical and flat-symmetrical synapses on spines, dendritic trunks, and cell bodies in area 17 of the cat. *J Comp Neurol* 231: 180–189.
- Beaulieu C, Kisvarday Z, Somogyi P, Cynader M, Cowey A (1992) Quantitative distribution of GABA-immunopositive and immunonegative neurons and synapses in the monkey striate cortex (area 17). *Cereb Cortex* 2: 295–309.
- Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yáñez I, DeFelipe J, Yuste R (2003) Cortical area and species differences in dendritic spine morphology. *J Neurocytol* 31: 337–346.
- Biederer T, Kaeser PS, Blanpied TA (2017) Transcellular Nanoalignment of synaptic function. *Neuron* 96: 680–696.
- Blazquez-Llorca L, Merchán-Pérez Á, Rodríguez JR, Gascón J, DeFelipe J (2013)

-
- FIB/SEM technology and AD: Three-dimensional analysis of human cortical synapses. *J Alzheimer's Dis* 34: 995-1013.
- Blazquez-Llorca L, Woodruff A, Inan M, Anderson SA, Yuste R, DeFelipe J et al (2015) Spatial distribution of neurons innervated by chandelier cells. *Brain Struct Funct* 220: 2817–2834.
- Braak H, Braak E (1985) On areas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocortex in the human brain. Normal morphology and lamina-specific pathology in AD. *Acta Neuropathol* 68: 325–332.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259.
- Braak H, Braak E (1992) The human entorhinal cortex: normal morphology and lamina-specific pathology in various diseases. *Neurosci Res* 15: 6-31.
- Braak E, Braak H, Mandelkow EM (1994) A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* 87: 554-567.
- Braak H, Braak E, Yilmazer D, Bohl J, Braak H, Braak E (1996) Topical review: functional anatomy of human hippocampal formation and related structures. *J Child Neurol* 11: 265–275.
- Braak H, Del Tredici K (2012) Where, when, and in what form does sporadic Alzheimer's disease begin? *Curr Opin Neurol* 25: 708–714.
- Braak H, Del Tredici K (2015) The preclinical phase of the pathological process underlying sporadic Alzheimer's disease. *Brain* 138: 2814-2833.
- Burgalossi A, Brecht M (2014) Cellular, columnar and modular organization of spatial representations in medial entorhinal cortex. *Curr Opin Neurobiol* 24: 47–54.
- Cai Q, Tammine P (2017) Mitochondrial Aspects of Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* 57: 1087-1103.
- Cajal SR (1890) Textura de las circunvoluciones cerebrales de los mamíferos inferiores. Nota preventiva. *Gac Méd Catalana* 1: 22-31.
- Choi KJ, Kim MJ, Je AR, Jun S, Lee C, Lee E et al (2014) Three-dimensional analysis of abnormal ultrastructural alteration in mitochondria of hippocampus of APP/PSEN1 transgenic mouse. *J Biosci* 39: 97–105.
- Colonnier M (1968) Synaptic Patterns On Different Cell Types In The Different Laminae Of The Cat Visual Cortex. An Electron Microscope Study. *Brain Res* 9: 268-287.
- DeFelipe J (1993) Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by co-localization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium binding proteins and cell surface molecules. *Cereb Cortex* 3: 273-289.
- DeFelipe J (1999) Chandelier cells and epilepsy. *Brain J Neurol* 122: 1807–1822.
- DeFelipe J (2011) The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits and intellectual creativity. *Front Neuroanat* 5: 29.
- DeFelipe J (2015) The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Front Neuroanat* 9.

- DeFelipe J, Alonso-Nanclares L, Arellano JI (2002) Microstructure of the neocortex: Comparative aspects. *Journal of Neurocytology* 31: 299-316.
- DeFelipe J, Fairén A (1993) A simple and reliable method for correlative light and electron microscopic studies. *J Histochem Cytochem* 41:769-772.
- DeFelipe J, Fariñas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic input. *Prog Neurobiol* 39: 563-607.
- DeFelipe J, Fernández-Gil MA, Kastanauskaite A, Palacios Bote R, Gañán Presmanes Y, Trinidad Ruiz M (2007) Macroanatomy and Microanatomy of the Temporal Lobe. *Semin Ultrasound CT MRI* 28: 404-415.
- DeFelipe J, Marco P, Busturia I, Merchán-Pérez A (1999) Estimation of the number of synapses in the cerebral cortex: Methodological considerations. *Cereb Cortex* 9: 722-732.
- Dickerson BC, Eichenbaum H (2010) The episodic memory system: Neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology* 35: 86-104.
- Dickson DW, Crystal HA, Bevona C, Honer W, Vincent I, Davies P (1995) Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol Aging* 16: 285-304.
- Didic M, Barbeau EJ, Felician O, Tramon E, Guedj E, Poncet M, Ceccaldi M (2011) Which Memory System is Impaired First in Alzheimer's Disease? *J Alzheimer's Dis* 27: 11-22.
- Diehl GW, Hon OJ, Leutgeb S, Leutgeb JK (2017) Grid and Nongrid Cells in Medial Entorhinal Cortex Represent Spatial Location and Environmental Features with Complementary Coding Schemes. *Neuron* 5: 83-92.
- Ding SL, Van Hoesen GW (2010) Borders, extent, and topography of human Perirhinal cortex as revealed using multiple modern neuroanatomical and pathological markers. *Hum Brain Map* 31: 1359-1379.
- Ding SL, Van Hoesen GW, Cassell MD, Poremba A (2009) Parcellation of Human Temporal Polar Cortex: A Combined Analysis of Multiple Cytoarchitectonic, Chemoarchitectonic, and Pathological Markers. *J Comp Neurol* 514: 595-623.
- Domínguez-Álvaro M, Montero-Crespo M, Blazquez-Llorca L, DeFelipe J, Alonso-Nanclares L (2019) 3D Electron Microscopy Study of Synaptic Organization of the Normal Human Transentorhinal Cortex and Its Possible Alterations in Alzheimer's Disease. *eNeuro* 6: 1-17.
- Domínguez-Álvaro M, Montero-Crespo M, Blazquez-Llorca L, Insausti R, DeFelipe J, Alonso-Nanclares L (2018) Three-dimensional analysis of synapses in the transentorhinal cortex of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol Commun* 6: 20.
- Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J (2015) Analyzing dendritic spine pathology in AD: problems and opportunities. *Acta Neuropathol* 130: 1-19.
- Du H, Guo L, Yan SS (2012) Synaptic Mitochondrial Pathology in Alzheimer's Disease. *Antioxid Redox Signal* 16: 1467-

- 1475.
- Duvernoy HM (2005) The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI. Third Edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- Engelhardt E, Gomes MM (2015) Alzheimer's 100th anniversary of death and his contribution to a better understanding of senile dementia. *Arquivos De Neuro-Psiquiatria* 73: 159-162.
- Fauth M, Tetzlaff C (2016) Opposing effects of neuronal activity on structural plasticity. *Front Neuroanat* 10: 75.
- Ferrer I (2012) Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. *Prog Neurobiol* 97: 38–51.
- Foster M, Sherrington CS (1897) A Text Book Of Physiology. Part III: central nervous system (Seventh ed.). Cambridge.
- Fuchs EC, Neitz A, Pinna R, Melzer S, Caputi A, Monyer H (2016) Local and Distant Input Controlling Excitation in Layer II of the Medial Entorhinal Cortex. *Neuron* 89: 194–208.
- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geinisman Y (2004a) Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. *J Comp Neurol* 468: 86–95.
- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geinisman Y (2004b) Synapses with a segmented, completely partitioned postsynaptic density express more AMPA receptors than other axospinous synaptic junctions. *Neurosci* 125: 615–623.
- Gao J, Wang L, Liu J, Xie F, Su B, Wang X (2017) Abnormalities of Mitochondrial Dynamics in Neurodegenerative Diseases. *Antioxidants* 6.
- García-Marín V, García-López P, Freire M (2007) Cajal's contributions to the study of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 12: 161-174.
- Geinisman Y, DeToledo-Morrell L, Morrell F (1991) Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities. *Brain Res* 566: 77–88.
- Geinisman Y, DeToledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE, Rossi M, Parshall RF (1993) Structural synaptic correlate of long-term potentiation: Formation of axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones. *Hippocampus* 3: 435-446.
- Geinisman Y, DeToledo-Morrell L, Morrell F, Persina IS, Rossi M (1992a) Structural synaptic plasticity associated with the induction of long-term potentiation is preserved in the dentate gyrus of aged rats. *Hippocampus* 2: 445–456.
- Geinisman Y, Morrell F, DeToledo-Morrell L (1987) Axospinous synapses with segmented postsynaptic densities: a morphologically distinct synaptic subtype contributing to the number of profiles of 'perforated' synapses visualized in random sections. *Brain Res* 423: 179–188.

- Geinisman Y, Morrell F, DeToledo-Morrell L (1992b) Increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities following hippocampal kindling. *Brain Res* 569: 341–347.
- Gómez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild AD. *J Neurosci* 16: 4491–4500.
- Grant SG (2012) Synaptopathies: diseases of the synaptome. *Curr Opin Neurobiol* 22: 522–529.
- Gray EG (1959a) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 4: 420–433.
- Gray EG (1959b) Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* 183: 1592–1593.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Miziller A, Nielsen K et al (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96: 379–394.
- Gunten A, Kövari E, Bussi re T, Rivara CB, Gold G, Bouras C et al (2006) Cognitive impact of neuronal pathology in the entorhinal cortex and CA1 field in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 27: 270–277.
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184–185.
- Henstridge CM, Pickett E, Spires-Jones TL (2016) Synaptic pathology: a shared mechanism in neurological disease. *Aging Res Rev* 28: 72–84.
- Hermes J, Dorostkar MM (2016) Dendritic spine pathology in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pathol* 11: 221–250.
- Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russel RL, Atwood CS et al (2001) Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease. *J Neurosci* 21: 3017–3023.
- Holderith N, Lorincz A, Katona G, R  za B, Kulik A, Watanabe M, Nusser Z (2012) Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat Neurosci* 15: 988–997.
- Honer WG, Dickson DW, Gleeson J, Davies P (1992) Regional synaptic pathology in AD. *Neurobiol Aging* 13: 375–382.
- Houser CR, Vaughn JE, Hendry SHC, Jones EG, Peters A (1984) GABA neurons in cerebral cortex. Functional Properties of Cortical Cells. In *Cerebral Cortex* (edited by Jones, E. G. & Peters, A.) pp. 63–89. New York: Plenum Press.
- Hsu A, Luebke JI, Medalla M (2017) Comparative ultrastructural features of excitatory synapses in the visual and frontal cortices of the adult mouse and monkey. *J Comp Neurol* 525: 2175–2191.
- Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al (2012) National institute on aging-alzheimer's association guidelines for the neuropathologic assessment of alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 8: 1–13.
- Hyman BT, Van Hoesen GW, Kromer LJ, Damasio AR (1986) Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 20: 472–81.

- Insausti R, Amaral DG (2012) The human hippocampal formation. Págs: 871-914. ISBN: 0125476264. 3ªEd. Elsevier Academic Press. San Diego, EE.UU.
- Insausti R, Juottonen K, Soininen H, Insausti AM, Partanen K, Vainio P, Laakso MP, Pitkanen A (1998) MR Volumetric Analysis of the Human Entorhinal, Perirhinal, and Temporopolar Cortices. *AJNR Am J Neuroradiol* 19: 659-671.
- Insausti R, Muñoz-López M, Insausti AM, Artacho-Pérula E (2017) The Human Periallocortex: Layer Pattern in Presubiculum, Parasubiculum and Entorhinal Cortex. A Review. *Front Neuroanat* 11: 84.
- Insausti R, Tuñón T, Sobreviela T, Insausti AM, Gonzalo LM (1995) The Human Entorhinal Cortex: A Cytoarchitectonic Analysis. *J Comp Neurol* 355:171-198.
- Jones EG, Powell TPS (1969) Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *Cell Sci* 5: 509-529.
- Kajiwara R, Takashima I, Mimura Y, Witter MP, Iijima T (2003) Amygdala input promotes spread of excitatory neural activity from perirhinal cortex to the entorhinal-hippocampal circuit. *Journal of Neurophysiology* 89: 2176-2184.
- Kashani A, Lepicard E, Poirel O, Videau C, David JP, Fallet-Bianco C et al (2008) Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the prefrontal cortex is correlated with cognitive decline in alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 29: 1619-1630.
- Kharazia VN, Weinberg RJ (1999) Immunogold localization of AMPA and NMDA receptors in somatic sensory cortex of albino rat. *J Comp Neurol* 412: 292-302.
- King DL, Arendash GW (2002) Maintained synaptophysin immunoreactivity in Tg2576 transgenic mice during aging: Correlations with cognitive impairment. *Brain Res* 926: 58-68.
- Knafo S, Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Ferrer I, DeFelipe J (2009) Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 19: 586-592.
- Kneussel M, Hausrat TJ (2016) Postsynaptic neurotransmitter receptor reserve pools for synaptic potentiation. *Trends Neurosci* 39: 170-182.
- Lane CA, Hardy J, Schott JM (2018) Alzheimer's disease. *Eur. J Neurol* 25: 59-70.
- Llorens-Martín M, Blazquez-Llorca L, Benavides-Piccione R, Rabano A, Hernandez F, Avila J, DeFelipe J (2014) Selective alterations of neurons and circuits related to early memory loss in Alzheimer's disease. *Front Neuroanat* 8: 38.
- Long JM, Holtzman DM (2019) Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* 179: 312-339.
- Lüscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D (2000) Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic. *Nat Neurosci* 3: 545-550.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, et al (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of AD. *Neurology* 56: 127-129.
- Masliah E, Terry RD, Alford M, Deteresa R (1990) Quantitative Immunohistochemistry of Synaptophysin in Human Neocor-

- tex: An Alternative Method to Estimate Density of Presynaptic Terminals in Paraffin Sections. *J Histochem Cytochem* 38: 837–844.
- Matz J, Gilyan A, Kolar A, McCarvill T, Krueger SR (2010) Rapid structural alterations of the active zone lead to sustained changes in neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 8836–8841.
- Merchán-Pérez A, Rodríguez JR, Alonso-Nanclares L, Schertel A, DeFelipe J (2009) Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Front Neuroanat* 3: 18.
- Merchán-Pérez A, Rodríguez JR, González S, Robles V, DeFelipe J, Larrañaga P et al (2014) Three-dimensional spatial distribution of synapses in the neocortex: a dual-beam electron microscopy study. *Cereb Cortex* 24: 1579–1588.
- Merino-Serrais P, Benavides-Piccione R, Blazquez-Llorca L, Kastanauskaite A, Rábano A, Avila J, DeFelipe J (2013) The influence of phospho- τ on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Brain* 136: 1913–1928.
- Merino-Serrais P, Knafo S, Alonso-Nanclares L, Feraud-Espinosa I, DeFelipe J (2011) Layer-Specific alterations to CA1 dendritic spines in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 21: 1037–1044.
- Micheva KD, Beaulieu C (1996) Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. *J Comp Neurol* 373: 340–354.
- Miller AC, Pereda AE (2017) The electrical synapse – molecular complexities at the gap and beyond. *Dev Neurobiol* 77: 562–574.
- Mironov (2017) Stereological morphometric grids for ImageJ. *Ultrastructural pathology* 41: 126.
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, et al (1991) The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). Part II standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41: 479–86.
- Montes J, Peña JM, DeFelipe J, Herreras O, Merchán-Pérez A (2015) The influence of synaptic size on AMPA receptor activation: a Monte Carlo model. *PLoS One* 10: e0130924.
- Morales J, Alonso-Nanclares L, Rodríguez JR, DeFelipe J, Rodríguez Á, Merchán-Pérez Á (2011) Espina: a tool for the automated segmentation and counting of synapses in large stacks of electron microscopy images. *Front Neuroanat* 18: 18.
- Morales J, Rodríguez A, Rodríguez JR, DeFelipe J, Merchán-Pérez A (2013) Characterization and extraction of the synaptic apposition surface for synaptic geometric analysis. *Front Neuroanat* 7: 20.
- Moreira PI, Siedlak SL, Wang X, Santos MS, Oliveira CR, Tabaton M et al (2007) Autophagocytosis of Mitochondria Is Prominent in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 66: 525–532.
- Moser EI, Moser MB, McNaughton BL (2017) Spatial representation in the hip-

- pocampal formation: a history. *Nat Neurosci* 20: 1448-1464.
- Nagy JI, Pereda AE, Rash JE (2018) Electrical synapses in mammalian CNS: past eras, present focus and future directions. *Biochim Biophys Acta* 1860: 102–123.
- Nusser Z, Hájos N, Somogyi P, Mody I (1998) Increased number of synaptic GABA_A receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* 395: 172-177.
- Oliver von Bohlen und Halbach (2009) Structure and function of dendritic spines within the hippocampus. *Ann Anat* 191: 518—531.
- Pereda AE (2014) Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci* 15: 250–263.
- Peters A, Kaiserman-Abramof IR (1970) The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat* 127: 321-356.
- Peters A, Kemper T (2012) A review of the structural alterations in the cerebral hemispheres of the aging rhesus monkey. *Neurobiol Aging* 33: 2357–2372.
- Peters A, Palay SL (1996) The morphology of synapses. *J Neurocytol* 25: 687–700.
- Peters A, Palay SL, Webster HD (1991) The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. Oxford University Press, New York, p 528.
- Pikkarainen M, Pitkänen A (2001) Projections from the lateral, basal and accessory basal nuclei of the amygdala to the perirhinal and postrhinal cortices in rat. *Cereb Cortex* 11: 1064-1082.
- Pozueta J, Lefort R, Shelanski ML (2013) Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. *Neuroscience* 251: 51–65.
- Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW Morris JC (2001) Neuron Number in the Entorhinal Cortex and CA1 in Preclinical Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 58: 1395-1402.
- Prieto C, Emil M, López de Silanes C, Llaneiro M (2011) Impacto social de la enfermedad de alzheimer y otras demencias. In: Fundación Española de Enfermedades Neurológicas.
- Rajmohan R, Reddy PH (2017) Amyloid-Beta and Phosphorylated tau accumulations cause abnormalities at synapses of AD neurons. *J Alzheimers Dis* 57: 975–999.
- Raskin J, Cummings J, Hardy J, Schuh K, Dean RA (2015) Neurobiology of alzheimer's disease: Integrated molecular, physiological, anatomical, biomarker, and cognitive dimensions. *Curr Alzheimer Res* 12: 712-722.
- Robinson JL, Lee EB, Xie SX, Rennert L, Suh E, Bredenberg C, et al (2018) Neurodegenerative disease concomitant proteinopathies are prevalent, age-related and APO-E4-associated. *Brain* 141:2181–2193.
- Ryan NS, Rossor MN, Fox NC (2015) Alzheimer's disease in the 100 years since alzheimer's death. *Brain* 138: 3816-3821.
- Santuy A, Rodríguez J, Defelipe J (2018a) Study of the Size and Shape of Synapses in the Juvenile Rat Somatosensory Cortex with 3D Electron Microscopy. *eNeuro* 5.
- Santuy A, Rodriguez JR, DeFelipe J, Merchán

- Pérez A (2018b) Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex. *Brain Struct Funct* 223: 77–90.
- Scheff SW, Dekosky ST, Price DA (1990) Quantitative Assessment of Cortical Synaptic Density in Alzheimer's Disease. *Neurobiol Aging* 11: 29-37.
- Scheff SW, Price DA (1993) Synapse loss in the temporal lobe in AD. *Ann Neurol* 33: 190-199.
- Scheff SW, Price DA (1998) Synaptic Density in the Inner Molecular Layer of the Hippocampal Dentate Gyrus in Alzheimer's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 1146-1153.
- Scheff SW, Price DA (2003) Synaptic pathology in AD: A review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging* 24: 1029–1046.
- Scheff SW, Price DA (2006) AD-related alterations in synaptic density: Neocortex and hippocampus. *J Alzheimer's Dis* 9: 101–115.
- Scheff SW, Price DA, Ansari MA, Roberts KN, Schmitt FA, Ikonomic MD, et al (2015) Synaptic change in the posterior cingulate gyrus in the progression of AD. *Alzheimers Dis* 43: 1073–1090.
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Dekosky ST, Mufson EJ (2007) Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68: 1501-8.
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ (2006) Hippocampal synaptic loss in early AD and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 27: 1372–1384.
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Scheff MA, Mufson EJ (2011) Synaptic Loss in the Inferior Temporal Gyrus in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *J Alzheimers Dis* 24: 547–557.
- Scheff SW, Sparks DL, Price DA (1993) Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in AD. *Ann Neurol* 34: 356-361.
- Scheff SW, Sparks DL, Price DA (1996) Quantitative Assessment of Synaptic Density in the Outer Molecular Layer of the Hippocampal Dentate Gyrus in Alzheimer's Disease. *Dementia* 7: 226-232.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20: 11-21.
- Segal M (2017) Dendritic spines: Morphological building blocks of memory. *Neurobiol Learn Mem* 138: 3-9.
- Selkoe DJ (2002) AD Is a Synaptic Failure. *Science* 298: 789-791.
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011) Neuropathological alterations in alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:1-23.
- Šimić G, Kostović I, Winblad B, Bogdanović N (1997) Volumen and Number of Neurons of the Human Hippocampal Formation in Normal Aging and Alzheimer's Disease. *J Comp Neurol* 379: 482-494.
- Spires-Jones TL, Hyman B (2014) The intersection of amyloid Beta and tau at synapses in AD. *Neuron* 82: 756–771.
- Spires-Jones TL, Meyer-Luehmann M, Osetek JD, Jones PB, Stern EA, Bacskai BJ,

- Hyman BT (2007) Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model. *Am J Pathol* 171: 1304–1311.
- Stafstrom CE (2006) Epilepsy: a review of selected clinical syndromes and advances in basic science. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 983–1004.
- Stensola T, Moser EI (2016) Grid Cells and Spatial Maps in Entorhinal Cortex and Hippocampus. In: Buzsáki G, Christen Y, editors. *Micro-, Meso- and Macro-Dynamics of the Brain*. Springer.
- Stern Y (2002) What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. *JINS* 8: 448–460.
- Stern Y (2006) Cognitive reserve and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20: 112–117.
- Stern Y (2009) Cognitive Reserve. *Neuropsychologia* 47: 2015–2028.
- Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI (2014) Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Neurosci* 15: 655–669.
- Südhof TC (2012) The presynaptic active zone. *Neuron* 75: 11–25.
- Suzuki WA (1996) The anatomy, physiology and functions of the perirhinal cortex. *Curr Opin Neurobiol* 6: 179–188.
- Suzuki WA, Amaral DG (1994a) Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and the perirhinal and parahippocampal cortices. *J Neurosci* 14: 1856–1877.
- Suzuki WA, Amaral DG (1994b) Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cortical afferents. *J Comp Neurol* 350: 497–533.
- Suzuki WA, Amaral DG (2003) Where are the perirhinal and parahippocampal cortices? A historical overview of the nomenclature and boundaries applied to the primate medial temporal lobe. *Neurosci* 120: 893–906.
- Suzuki WA, Naya Y (2014) The Perirhinal Cortex. [Review]. *Annu Rev Neurosci* 37: 39–53.
- Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ (1997) Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 933–944.
- Tackenberg C, Ghori A, Brandt R (2009) Thin, stubby or mushroom: spine pathology in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 6: 261–268.
- Takumi Y, Ramirez-Leon V, Laake P, Rinivik E, Ottersen OP (1999) Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 2: 618–624.
- Tampellini D (2015) Synaptic activity and Alzheimer's disease: a critical update. *Front Neurosci* 9: 423.
- Tarusawa E, Matsui K, Budisantoso T, Molnar E, Watanabe M, Matsui M, Fukazawa Y, Shigemoto R (2009) Input-specific intrasynaptic arrangements of ionotropic glutamate receptors and their impact on postsynaptic responses. *J Neurosci* 29:12896–12908.
- Taylor KI, Probst A (2008) Anatomic localization of the transentorhinal region of

- the perirhinal cortex. *Neurobiol Aging* 29: 1591–1596.
- Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R et al (1991) Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease: Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment. *Ann Neurol* 30: 572–580.
- Thal DR, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, Braak H (2006) The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Science of Aging Knowledge Environment* 6.
- Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H (2002) Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurobiol Aging* 23: 1791–1800.
- Toni N, Buchs P, Nikonenko I, Povilaitite P, Parisi L, Muller D (2001) Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. *J Neurosci* 21: 6245–6251.
- Tönnies E, Trushina E (2017) Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 57: 1105–1121.
- Van Hoesen GW (1995) Anatomy of the Medial Temporal Lobe. *Magn Reson Imaging* 13: 1047–1055.
- Van Hoesen GW, Hyman BT (1990) Hippocampal formation: anatomy and the patterns of pathology in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 83: 445–57.
- Van Hoesen GW, Hyman BT, Damasio AR (1991) Entorhinal cortex pathology in AD. *Hippocampus* 1: 1–8.
- Wang L, Guo L, Lu L, Sun H, Shao M, Beck SJ et al (2016) Synaptosomal Mitochondrial Dysfunction in 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 11: e0150441.
- Wegner W, Mott AC, Grant SG, Steffens H, Willig KI (2018) In vivo STED microscopy visualizes PSD95 sub-structures and morphological changes over several hours in the mouse visual cortex. *Sci Rep* 8: 219.
- Wilson RS, Segawa E, Boyle PA, Anagnos SE, Hibel LP, Bennett DA (2012) The natural history of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Psychol Aging* 27: 1008–1017.
- Yuste R (2010) Dendritic spines. *Massachusetts: MIT*.
- Zhou L, McInnes J, Wierda K, Holt M, Herrmann AG, Jackson RJ et al (2017) Tau association with synaptic vesicles causes presynaptic dysfunction. *Nat Commun* 8: 15295.
- Zou C, Montagna E, Shi Y, Peters F, Blazquez-Llorca L, Shi S, Filser S, Dorostkar MM, Herms J (2015) Intraneuronal APP and extracellular A β independently cause dendritic spine pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 129: 909–920.

VIII. ANEXO 1: Tablas suplementarias

Caso	V_{neu} (%; mean \pm SD)	V_g (%; mean \pm SD)	V_{vs} (%; mean \pm SD)	V_n (%; mean \pm SD)	Grosor CTE (mm; mean \pm SD)
AB1	6.13 \pm 0.31	0.26 \pm 0.03	2.75 \pm 0.04	90.86 \pm 0.06	2.74 \pm 0.08
AB2	8.02 \pm 1.25	0.52 \pm 0.02	3.08 \pm 1.26	88.38 \pm 1.68	2.56 \pm 0.09
IF10	6.28 \pm 0.05	0.61 \pm 0.01	3.77 \pm 0.06	89.34 \pm 0.07	2.06 \pm 0.05
M16	8.29 \pm 1.09	0.51 \pm 0.02	3.61 \pm 1.18	87.59 \pm 1.64	2.96 \pm 0.06
M17	7.13 \pm 1.08	0.59 \pm 0.01	3.19 \pm 0.03	89.09 \pm 0.09	2.96 \pm 0.06
IF1	5.01 \pm 0.05	0.27 \pm 0.01	2.96 \pm 0.01	91.76 \pm 0.05	2.26 \pm 0.12
IF2	5.46 \pm 0.05	0.54 \pm 0.01	3.60 \pm 0.02	90.40 \pm 0.08	1.20 \pm 0.03
IF6	7.07 \pm 0.07	0.26 \pm 0.00	3.89 \pm 0.04	88.78 \pm 1.10	1.89 \pm 0.10
VK11	5.39 \pm 0.06	0.32 \pm 0.01	3.81 \pm 0.04	90.48 \pm 0.06	1.79 \pm 0.06
VK22	6.37 \pm 0.08	0.37 \pm 0.01	4.26 \pm 0.03	89.00 \pm 1.01	1.57 \pm 0.09

Tabla suplementaria 1. Datos de microscopia óptica de la fracción de volumen ocupada por los elementos corticales y grosor cortical en la capa II de la CTE por individuo. V_{neu} : fracción de volumen ocupado por neuronas; V_g : fracción de volumen ocupado por glia; V_{vs} : fracción de volumen ocupado por vasos sanguíneos; V_n : fracción de volumen ocupado por neuropilo.

Caso	V_{neu} (%; mean)	V_g (%; mean)	V_{vs} (%; mean)	V_n (%; mean)	Grosor CE (mm; mean± SD)
AB1	4.19	1.74	2.56	91.50	2.12±0.06
AB3	8.67	2.44	2.72	86.17	2.08±0.01
IF10	2.86	4.16	7.29	85.69	1.75±0.05
M16	2.23	2.23	2.62	92.91	2.04±0.02
IF1	3.97	3.44	3.84	88.75	2.30±0.03
VK11	2.88	4.68	3.55	88.89	1.40±0.01
VK16	0.63	5.65	0.75	92.97	1.19±0.01
VK22	2.96	4.59	1.20	91.25	1.51±0.02

Tabla suplementaria 2. Datos de microscopia óptica de la fracción de volumen ocupada por los elementos corticales y grosor cortical en la capa II de la CE por individuo. V_{neu}: fracción de volumen ocupado por neuronas; V_g: fracción de volumen ocupado por glia; V_{vs}: fracción de volumen ocupado por vasos sanguíneos; V_n: fracción de volumen ocupado por neuropilo.

Caso	V_{neu} (%; mean)	V_g (%; mean)	V_{vs} (%; mean)	V_n (%; mean)	Grosor CE (mm; mean± SD)
AB1	9.56	2.23	3.82	84.39	2.12±0.06
AB3	7.82	2.10	3.11	86.97	2.08±0.01
IF10	5.22	2.95	4.82	87.01	1.75±0.05
M16	7.53	2.80	3.44	86.23	2.04±0.02
IF1	4.29	2.40	3.44	89.87	2.30±0.03
VK11	3.99	4.66	5.69	85.66	1.40±0.01
VK16	1.79	4.24	0.36	93.60	1.19±0.01
VK22	1.41	6.91	6.44	85.24	1.51±0.02

Tabla suplementaria 3. Datos de microscopia óptica de la fracción de volumen ocupada por los elementos corticales y grosor cortical en la capa III de la CE por individuo. V_{neu}: fracción de volumen ocupado por neuronas; V_g: fracción de volumen ocupado por glia; V_{vs}: fracción de volumen ocupado por vasos sanguíneos; V_n: fracción de volumen ocupado por neuropilo.

Caso	Nº SA	Nº SS	Nº total sinapsis	% SA (media± SD)	% SS (media± SD)	Marco inclusión (µm ³)	Nº SA sinapsis/µm ³ (media± SD)	Nº SS sinapsis/µm ³ (media± SD)	Nº total sinapsis/µm ³ (media± SD)	V _m (%; media± SD)	Distancia al vecino más cercano (nm; media± SD)
AB1	409	25	434	94.12±1.35	5.88±1.35	1045	0.39±0.03	0.02±0.01	0.41±0.03	6.11±0.004	812.32 ±33.31
AB2	432	13	445	97.24±1.55	2.76±1.55	820	0.51±0.05	0.02±0.01	0.53±0.05	6.00±0.007	757.95±17.24
IF10	418	22	440	94.99±0.58	5.01±0.58	1057	0.40±0.01	0.02±0.00	0.42±0.01	6.91±0.010	860.07 ±19.27
M16	575	26	601	95.31±1.51	4.69±1.51	1389	0.41±0.08	0.02±0.00	0.43±0.08	5.49±0.006	848.46±88.77
M17	711	25	736	96.52±0.62	3.48±0.62	983	0.72±0.09	0.03±0.00	0.75±0.09	8.57±0.004	678.91±23.33
IF1	349	23	372	93.77±2.20	6.23±2.20	1123	0.31±0.01	0.02±0.01	0.33±0.02	5.90±0.011	891.30±41.18
IF2	439	21	460	95.29±1.36	4.71±1.36	1156	0.38±0.09	0.02±0.00	0.40±0.09	6.58±0.007	816.73±34.19
IF6	430	25	455	94.20±2.38	5.80±2.38	959	0.45±0.11	0.03±0.01	0.48±0.10	5.33±0.004	807.28 ±86.63
VK11	533	25	558	95.19±1.96	4.81±1.96	1128	0.47±0.14	0.02±0.01	0.49±0.14	7.26±0.003	789.90±111.26
VK22	136	9	145	93.88±1.18	6.12±1.18	900	0.15±0.02	0.01±0.00	0.16±0.02	6.34±0.003	1102.29±105.22

Tabla suplementaria 4. Datos del análisis ultraestructural del neuropilo de la capa II de la CTE por sujeto. Todos los datos están corregidos con el factor correspondiente.

Caso	Nº SA	Nº SS	Nº total sinapsis	% SA (media± SD)	% SS (media± SD)	Marco inclusión (µm³)	Nº SA sinapsis/µm³ (media± SD)	Nº SS sinapsis/µm³ (media± SD)	Nº total sinapsis/µm³ (media± SD)	V _m (%; media± SD)	Distancia al vecino más cercano (nm; media± SD)
AB1	379	27	406	93.11±2.86	6.89±2.86	986	0.39±0.07	0.02±0.01	0.41±0.06	5.49±0.019	819.20±41.97
AB3	397	39	436	90.81±1.10	9.19±1.10	1139	0.35±0.09	0.03±0.00	0.38±0.09	5.26±0.002	852.89±58.17
IF10	376	22	398	94.50±1.43	5.50±1.43	1059	0.36±0.04	0.02±0.01	0.38±0.04	4.24±0.001	773.35±27.47
M16	401	49	450	89.18±1.06	10.82±1.06	1037	0.39±0.01	0.04±0.00	0.43±0.00	6.48±0.005	799.82±38.93
IF1	219	20	239	91.50±1.65	8.50±1.65	1128	0.19±0.02	0.02±0.00	0.21±0.02	4.99±0.009	985.73±32.08
VK11	313	17	330	95.55±2.55	4.45±2.55	998	0.30±0.07	0.02±0.01	0.32±0.08	5.60±0.005	796.14±101.16
VK16	126	22	148	85.23±1.51	14.77±1.51	1186	0.10±0.01	0.02±0.00	0.12±0.02	3.28±0.007	1012.63±16.13
VK22	296	31	327	89.86±3.67	10.14±3.67	1097	0.26±0.05	0.03±0.01	0.29±0.04	4.66±0.005	830.58±56.64

Tabla suplementaria 5. Datos del análisis ultraestructural del neuropilo de la capa II de la CE por sujeto. Todos los datos están corregidos con el factor correspondiente.

Caso	Nº SA	Nº SS	Nº total sinapsis	% SA (media± SD)	% SS (media± SD)	Marco inclusión (µm³)	Nº SA sinapsis/µm³ (media± SD)	Nº SS sinapsis/µm³ (media± SD)	Nº total sinapsis/µm³ (media± SD)	V _m (%; media± SD)	Distancia al vecino más cercano (nm; media± SD)
AB1	421	36	457	92.12±1.15	7.88±1.15	1049	0.40±0.03	0.03±0.01	0.44±0.04	6.18±0.004	819.99±28.51
AB3	446	35	481	92.84±0.92	7.16±0.92	1089	0.41±0.04	0.03±0.01	0.44±0.04	5.44±0.007	871.68±66.36
IF10	469	27	496	94.14±1.53	5.86±1.53	1143	0.41±0.17	0.02±0.00	0.43±0.17	5.34±0.005	771.54±113.75
M16	411	32	443	92.27±3.61	7.73±3.61	1090	0.38±0.11	0.03±0.01	0.41±0.11	6.12±0.007	827.51±52.24
IF1	298	40	338	87.08±11.64	12.92±11.64	1240	0.24±0.07	0.03±0.02	0.27±0.06	6.15±0.004	918.76±91.57
VK11	265	13	278	95.36±0.56	4.64±0.56	1040	0.26±0.06	0.01±0.00	0.27±0.06	5.28±0.003	839.22±102.26
VK16	152	2	154	98.50±1.85	1.50±1.85	1238	0.12±0.08	0.00±0.00	0.12±0.08	3.59±0.008	1274.96±334.06
VK22	258	37	295	87.55±1.09	12.45±1.09	1079	0.24±0.04	0.03±0.01	0.27±0.05	4.29±0.004	846.91±120.13

Tabla suplementaria 6. Datos del análisis ultraestructural del neuropilo de la capa III de la CE por sujeto. Todos los datos están corregidos con el factor correspondiente.

Caso	Tipo de sinapsis	Área SAS (nm ² ; media± sem)	Perímetro SAS (nm; media± sem)
AB1	SA	140718±5250	1786±47
	SS	73839±9793	1354±111
AB2	SA	85838±3842	1418±43
	SS	48329±7450	1346±164
IF10	SA	128162±4403	1668±35
	SS	83442±10768	1428±105
M16	SA	116514±3509	1623±32
	SS	84247±8770	1514±110
M17	SA	118951±4290	1740±45
	SS	78095±6095	1431±86
IF1	SA	122257±4738	1632±45
	SS	85542±8020	1497±96
IF2	SA	125035±4725	1668±41
	SS	50771±5929	1176±81
IF6	SA	116269±5171	1683±55
	SS	81554±8538	1384±83
VK11	SA	122618±4278	1774±48
	SS	53956±5388	1111±70
VK22	SA	143809±10586	1695±70
	SS	61927±8655	1193±103

Tabla suplementaria 7. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y de las SS de la capa II de la CTE por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente.

Caso	Tipo de sinapsis	Área SAS (nm ² ; media± sem)	Perímetro SAS (nm; media± sem)
AB1	SA	101766±3757	1551±41
	SS	58790±6865	1252±118
AB3	SA	109320±3694	1605±38
	SS	71082±13154	1593±226
IF10	SA	113399±4343	1770±51
	SS	53681±4642	1331±112
M16	SA	116757±4139	1598±40
	SS	80435±6621	1440±74
IF1	SA	163933±7143	1909±55
	SS	77503±12221	1422±142
VK11	SA	120779±5614	1858±66
	SS	53824±6035	1236±81
VK16	SA	142393±15315	1841±131
	SS	46667±5245	1070±77
VK22	SA	117558±5198	1668±50
	SS	58932±6912	1227±88

Tabla suplementaria 8. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y de las SS de la capa II de la CE por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente.

Caso	Tipo de sinapsis	Área SAS (nm ² ; media± sem)	Perímetro SAS (nm; media± sem)
AB1	SA	116843±3974	1673±44
	SS	60978±5015	1220±79
AB3	SA	132252±4051	1859±47
	SS	67083±5083	1444±90
IF10	SA	121736±4345	1991±61
	SS	65338±9444	1578±210
M16	SA	125900±4790	1779±55
	SS	76379±10422	1354±129
IF1	SA	146264±5934	1975±73
	SS	99073±8446	2149±171
VK11	SA	134348±7330	1858±83
	SS	46814±13543	1161±254
VK16	SA	106568±7258	1511±54
	SS	46515±7167	1103±20
VK22	SA	103726±5248	1536±53
	SS	36680±2946	959±57

Tabla suplementaria 9. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y de las SS de la capa III de la CE por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente.

Caso	Tipo de sinapsis	Macular	Perforada	Herradura	Fragmentada	Nº Total sinapsis
AB1	SA	79.3% (318)	13.9% (56)	6.5% (26)	0.3% (1)	100% (401)
	SS	84.0% (21)	0% (0)	16.0% (4)	0% (0)	100% (25)
AB2	SA	88.5% (383)	7.4% (32)	3.9% (17)	0.2% (1)	100% (433)
	SS	81.3% (13)	0% (0)	18.7% (3)	0% (0)	100% (16)
IF10	SA	84.3% (348)	13.3% (55)	2.4% (10)	0% (0)	100% (413)
	SS	84.6% (22)	0% (0)	15.4% (4)	0% (0)	100% (26)
M16	SA	88.8% (524)	7.8% (46)	3.1% (18)	0.3% (2)	100% (590)
	SS	85.8% (24)	7.1% (2)	7.1% (2)	0% (0)	100% (28)
M17	SA	79.0% (572)	15.6% (113)	3.7% (27)	1.7% (12)	100% (724)
	SS	81.2% (26)	9.4% (3)	9.4% (3)	0% (0)	100% (32)
IF1	SA	86.3% (303)	6.8% (24)	4.9% (17)	2.0% (7)	100% (351)
	SS	96.0% (24)	0% (0)	4.0% (1)	0% (0)	100% (25)
IF2	SA	85.0% (379)	13.0% (58)	1.1% (5)	0.9% (4)	100% (446)
	SS	100% (25)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	100% (25)
IF6	SA	78.3% (342)	10.5% (46)	8.9% (39)	2.3% (10)	100% (437)
	SS	79.3% (23)	20.7% (6)	0% (0)	0% (0)	100% (29)
VK11	SA	76.6% (416)	14.8% (80)	6.6% (36)	2.0% (11)	100% (543)
	SS	93.1% (27)	6.9% (2)	0% (0)	0% (0)	100% (29)
VK22	SA	85.5% (118)	9.4% (13)	2.9% (4)	2.2% (3)	100% (138)
	SS	100% (11)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	100% (11)

Tabla suplementaria 10. Proporción de sinapsis maculares, perforadas, herradura y fragmentadas en la capa II de la CTE por casos individuales. Entre paréntesis de muestran los valores absolutos.

Caso	Tipo de sinapsis	Macular	Perforada	Herradura	Fragmentada	Nº Total sinapsis
AB1	SA	84.7% (320)	9.8% (37)	4.5% (17)	1.0% (4)	100% (378)
	SS	74.1% (20)	7.4% (2)	18.5% (5)	0% (0)	100% (27)
AB3	SA	82.6% (327)	13.6% (54)	2.5% (10)	1.3% (5)	100% (396)
	SS	66.6% (26)	15.4% (6)	15.4% (6)	2.6% (1)	100% (39)
IF10	SA	81.6% (307)	14.1% (53)	4.0% (15)	0.3% (1)	100% (376)
	SS	72.7% (16)	9.1% (2)	18.2% (4)	0% (0)	100% (22)
M16	SA	83.0% (331)	14.0% (56)	2.3% (9)	0.7% (3)	100% (399)
	SS	77.6% (38)	10.2% (5)	12.2% (6)	0% (0)	100% (49)
IF1	SA	86.8% (190)	9.6% (21)	3.2% (7)	0.4% (1)	100% (219)
	SS	70.0% (14)	15.0% (3)	15.0% (3)	0% (0)	100% (20)
VK11	SA	77.3% (242)	14.7% (46)	6.1% (19)	1.9% (6)	100% (313)
	SS	58.8% (10)	23.5% (4)	11.8% (2)	5.9% (1)	100% (17)
VK16	SA	79.4% (100)	19.0% (24)	1.6% (2)	0% (0)	100% (126)
	SS	77.3% (17)	0% (0)	18.2% (4)	4.5% (1)	100% (22)
VK22	SA	80.1% (237)	12.5% (37)	6.4% (19)	1.0% (3)	100% (296)
	SS	80.6% (25)	12.9% (4)	6.5% (2)	0% (0)	100% (31)

Tabla suplementaria 11. Proporción de sinapsis maculares, perforadas, herradura y fragmentadas en la capa II de la CE por casos individuales. Entre paréntesis de muestran los valores absolutos.

Caso	Tipo de sinapsis	Macular	Perforada	Herradura	Fragmentada	Nº Total sinapsis
AB1	SA	78.6% (330)	17.6% (74)	3.6% (15)	0.2% (1)	100% (420)
	SS	80.0% (28)	5.7% (2)	11.4% (4)	2.9% (1)	100% (35)
AB3	SA	73.5% (328)	21.1% (94)	3.4% (15)	2.0% (9)	100% (446)
	SS	48.6% (17)	14.3% (5)	37.1% (13)	0% (0)	100% (35)
IF10	SA	76.3% (358)	19.6% (92)	3.7% (17)	0.4% (2)	100% (469)
	SS	66.7% (18)	22.2% (6)	11.1% (3)	0% (0)	100% (27)
M16	SA	75.4% (310)	21.2% (87)	2.7% (11)	0.7% (3)	100% (411)
	SS	68.8% (22)	21.9% (7)	6.2% (2)	3.1% (1)	100% (32)
IF1	SA	78.5% (234)	10.1% (30)	6.7% (20)	4.7% (14)	100% (298)
	SS	60.0% (24)	12.5% (5)	17.5% (7)	10.0% (4)	100% (40)
VK11	SA	77.4% (205)	15.8% (42)	3.8% (10)	3.0% (8)	100% (265)
	SS	76.9% (10)	7.7% (1)	7.7% (1)	7.7% (1)	100% (13)
VK16	SA	92.8% (141)	4.6% (7)	2.6% (4)	0% (0)	100% (152)
	SS	100.0% (2)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	100% (2)
VK22	SA	87.6% (226)	7.7% (20)	3.1% (8)	1.6% (4)	100% (258)
	SS	86.5% (32)	5.4% (2)	5.4% (2)	2.7% (1)	100% (37)

Tabla suplementaria 12. Proporción de sinapsis maculares, perforadas, herradura y fragmentadas en la capa III de la CE por casos individuales. Entre paréntesis de muestran los valores absolutos.

Caso	Tipo de sinapsis	Macular	Perforada	Herradura	Fragmentada
AB1	SA Área (nm ²)	105023±3639	270449±15301	282901±28535	163133±0
	SS Área (nm ²)	61950±6787	83805±0	137592±53917	-
	SA Perímetro (nm)	1448±29	2821±123	3539±267	1484±0
	SS Perímetro (nm)	1191±90	1609±0	2041±475	-
AB2	SA Área (nm ²)	67926±2473	226369±16965	216500±43744	293563±0
	SS Área (nm ²)	48717±7971	-	50407±17313	-
	SA Perímetro (nm)	1193±25	2568±132	3568±527	4441±0
	SS Perímetro (nm)	1243±155	-	1681±370	-
IF10	SA Área (nm ²)	105815±3348	258672±16364	191958±27334	-
	SS Área (nm ²)	78384±11575	-	97550±7924	-
	SA Perímetro (nm)	1472±28	2696±118	2593±242	-
	SS Perímetro (nm)	1281±82	-	2005±353	-
M16	SA Área (nm ²)	99173±2817	263519±14443	229379±20144	347713±147088
	SS Área (nm ²)	77491±8048	160301±40991	48173±7668	-
	SA Perímetro (nm)	1440±24	2818±120	3560±357	2853±287
	SS Perímetro (nm)	1380±89	2830±175	1468±121	-
M17	SA Área (nm ²)	71956±1955	276816±11474	319122±22488	378759±34508
	SS Área (nm ²)	76481±5740	81838±22867	92148±14692	-
	SA Perímetro (nm)	1251±20	3204±111	4533±282	4070±489
	SS Perímetro (nm)	1380±67	1737±310	2009±321	-

Tabla suplementaria 13. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS maculares, perforadas, herraduras y fragmentada de la capa II de la CTE en el grupo control por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.

Caso	Tipo de sinapsis	Macular	Perforada	Herradura	Fragmentada
IF1	SA Área (nm ²)	100907±3748	260533±24238	230213±23176	287087±46357
	SS Área (nm ²)	81206±7953	-	115312±0	-
	SA Perímetro (nm)	1411±31	2788±197	3476±281	2554±423
	SS Perímetro (nm)	1464±88	-	2431±0	-
IF2	SA Área (nm ²)	97635±3457	282075±14960	242339±31835	255613±61346
	SS Área (nm ²)	48899±5282	-	-	-
	SA Perímetro (nm)	1431±30	2926±131	3194±242	3097±529
	SS Perímetro (nm)	1166±83	-	-	-
IF6	SA Área (nm ²)	75514±2767	253788±20199	229927±16554	398874±34133
	SS Área (nm ²)	63937±7017	136956±12469	-	-
	SA Perímetro (nm)	1238±26	2836±181	3540±250	3908±325
	SS Perímetro (nm)	1300±117	1869±85	-	-
VK11	SA Área (nm ²)	84283±3277	227967±9669	252819±15381	289573±34532
	SS Área (nm ²)	46245±4993	81718±39489	-	-
	SA Perímetro (nm)	1337±32	2893±133	3774±185	2826±346
	SS Perímetro (nm)	1017±68	1494±507	-	-
VK22	SA Área (nm ²)	114952±8344	371820±43322	205403±49825	143721±45612
	SS Área (nm ²)	58849±7432	-	-	-
	SA Perímetro (nm)	1517±62	2908±190	2852±449	1353±397
	SS Perímetro (nm)	1182±86	-	-	-

Tabla suplementaria 14. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS maculares, perforadas, herraduras y fragmentada de la capa II de la CTE en el grupo con EA por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.

Caso	Tipo de sinapsis	Macular	Perforada	Herradura	Fragmentada
AB1	SA Área (nm ²)	85237±3078	216268±13507	148918±21062	185076±61975
	SS Área (nm ²)	48692±6567	70784±24958	94387±18422	-
	SA Perímetro (nm)	1356±31	2741±141	2557±277	2116±614
	SS Perímetro (nm)	1040±95	1618±313	1955±349	-
AB3	SA Área (nm ²)	89345±2910	199638±11042	212980±29670	232981±49164
	SS Área (nm ²)	41969±4522	160179±72216	94637±15410	152108±0
	SA Perímetro (nm)	1384±26	2446±100	3433±419	3269±749
	SS Perímetro (nm)	1114±84	2930±1299	2178±204	2500±0
IF10	SA Área (nm ²)	88230±2871	234301±15369	198894±27110	149946±0
	SS Área (nm ²)	49216±5714	66229±578	65269±8887	-
	SA Perímetro (nm)	1450±31	3016±151	3857±393	2679±0
	SS Perímetro (nm)	1175±110	1185±15	2026±216	-
M16	SA Área (nm ²)	94810±3227	225006±13888	204160±29931	228481±65289
	SS Área (nm ²)	74986±5759	120162±45700	81843±13766	-
	SA Perímetro (nm)	1364±27	2589±141	3122±387	3209±385
	SS Perímetro (nm)	1358±71	1796±435	1660±160	-

Tabla suplementaria 15. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS maculares, perforadas, herraduras y fragmentada de la capa II de la CE en el grupo control por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.

Caso	Tipo de sinapsis	Macular	Perforada	Herradura	Fragmentada
IF1	SA Área (nm ²)	140535±6068	310912±23589	307401±35302	518740±0
	SS Área (nm ²)	61762±9105	114973±49321	113494±50826	-
	SA Perímetro (nm)	1724±45	2860±156	3582±362	5225±0
	SS Perímetro (nm)	1223±110	1772±532	2001±546	-
VK11	SA Área (nm ²)	87187±4255	251333±14305	198917±28402	243436±46709
	SS Área (nm ²)	50004±6946	76765±20090	45946±9776	42771±0
	SA Perímetro (nm)	1451±48	3181±184	3150±277	4213±545
	SS Perímetro (nm)	1150±100	1467±251	1397±20	1173±0
VK16	SA Área (nm ²)	85012±5554	374039±55334	231700±180974	-
	SS Área (nm ²)	40868±5931	-	66351±7216	66505±0
	SA Perímetro (nm)	1319±48	3866±444	3644±2070	-
	SS Perímetro (nm)	940.8±69	-	1521±132	1473±0
VK22	SA Área (nm ²)	92907±3770	224014±20145	185470±18785	227051±98763
	SS Área (nm ²)	49441±4622	69342±13461	156747±61717	-
	SA Perímetro (nm)	1403±36	2678±177	2808±191	2540±567
	SS Perímetro (nm)	1090±64	1512±233	2365±555	-

Tabla suplementaria 16. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS maculares, perforadas, herraduras y fragmentada de la capa II de la CE en el grupo con EA por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.

Caso	Tipo de sinapsis	Macular	Perforada	Herradura	Fragmentada
AB1	SA Área (nm ²)	91022±2912	218179±11377	163793±20950	367034±0
	SS Área (nm ²)	56244±5646	72319±16798	91527±6773	67857±0
	SA Perímetro (nm)	1379±28	2727±144	2712±256	3139±0
	SS Perímetro (nm)	1129±81	1594±367	1780±93	958.4±0
AB3	SA Área (nm ²)	103438±3337	214528±10025	197299±19829	211000±29426
	SS Área (nm ²)	56646±5959	95631±22973	69752±5378	-
	SA Perímetro (nm)	1490±31	2741±125	3324±281	3707±366
	SS Perímetro (nm)	1158±68	1591±247	1762±166	-
IF10	SA Área (nm ²)	85111±2815	243775±9741	205340±30774	353249±36592
	SS Área (nm ²)	40145±4832	92302±7466	162572±40083	-
	SA Perímetro (nm)	1483±33	3468±153	4359±480	4815±982
	SS Perímetro (nm)	1031±59	1952±145	4107±814	-
M16	SA Área (nm ²)	91376±3303	235745±12541	187017±29982	283731±43955
	SS Área (nm ²)	57179±7183	108175±18649	87028±43374	305904±0
	SA Perímetro (nm)	1368±29	2918±149	3391±427	5356±1689
	SS Perímetro (nm)	1123±93	1642±220	1722±561	4207±0

Tabla suplementaria 17. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS maculares, perforadas, herraduras y fragmentada de la capa III de la CE en el grupo control por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.

Caso	Tipo de sinapsis	Macular	Perforada	Herradura	Fragmentada
IF1	SA Área (nm ²)	114267±4394	245056±24109	245531±21737	327570±32188
	SS Área (nm ²)	74465±8106	147194±11354	115641±19952	157571±34148
	SA Perímetro (nm)	1544±36	2815±240	3760±328	4821±607
	SS Perímetro (nm)	1568±122	2939±453	2768±425	3560±547
VK11	SA Área (nm ²)	94202±4856	300678±24113	179886±34404	232942±36281
	SS Área (nm ²)	34427±4875	201631±0	-	28260±0
	SA Perímetro (nm)	1388±45	3547±316	2873±470	3774±276
	SS Perímetro (nm)	903.2±77	4108±0	-	1054±0
VK16	SA Área (nm ²)	92764±5053	359834±71189	149938±27139	-
	SS Área (nm ²)	46515±7167	-	-	-
	SA Perímetro (nm)	1398±42	3252±256	2463±320	-
	SS Perímetro (nm)	1103±20	-	-	-
VK22	SA Área (nm ²)	83413±3752	279055±22509	195288±26219	191608±78250
	SS Área (nm ²)	34332±3010	52496±5164	64646±7886	24232±0
	SA Perímetro (nm)	1317±35	3154±202	3370±444	2137±622
	SS Perímetro (nm)	905±51	1123±82	1810±102	659.6±0

Tabla suplementaria 18. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS maculares, perforadas, herraduras y fragmentada de la capa III de la CE en el grupo con EA por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.

Caso	Tipo de sinapsis	Sinapsis en cabeza	Sinapsis en cuello	Sinapsis en tallos sin espinas	Sinapsis en tallos con espinas	Nº Total sinapsis
AB1	SA	60.7% (153)	0.8% (2)	22.2% (56)	16.3% (41)	100% (252)
	SS	13.6% (3)	0% (0)	36.4% (8)	50.0% (11)	100% (22)
AB2	SA	53.2% (91)	0.6% (1)	25.7% (44)	20.5% (35)	100% (171)
	SS	0% (0)	6.3% (1)	62.5% (10)	31.2% (5)	100% (16)
IF10	SA	48.7% (150)	0.7% (2)	22.7% (70)	27.9% (86)	100% (308)
	SS	4.0% (1)	0% (0)	44.0% (11)	52.0% (13)	100% (25)
M16	SA	58.6% (238)	0.5% (2)	17.2% (70)	23.7% (96)	100% (406)
	SS	8.3% (2)	0% (0)	16.7% (4)	75.0% (18)	100% (24)
M17	SA	74.5% (193)	0% (0)	14.7% (38)	10.8% (28)	100% (259)
	SS	8.0% (2)	0% (0)	40.0% (10)	52.0% (13)	100% (25)
IF1	SA	59.9% (161)	0.4% (1)	16.7% (45)	23.0% (62)	100% (269)
	SS	17.4% (4)	0% (0)	26.1% (6)	56.5% (13)	100% (23)
IF2	SA	45.7% (116)	1.2% (3)	23.6% (60)	29.5% (75)	100% (254)
	SS	25.0% (5)	0% (0)	20.0% (4)	55.0% (11)	100% (20)
IF6	SA	56.8% (151)	0.4% (1)	24.4% (65)	18.4% (49)	100% (266)
	SS	0% (0)	0% (0)	33.3% (8)	66.7% (16)	100% (24)
VK11	SA	46.9% (127)	0.4% (1)	35.4% (96)	17.3% (47)	100% (271)
	SS	0% (0)	0% (0)	64.0% (16)	36.0% (9)	100% (25)
VK22	SA	25.8% (24)	2.2% (2)	61.3% (57)	10.7% (10)	100% (93)
	SS	0% (0)	10.0% (1)	80.0% (8)	10.0% (1)	100% (10)

Tabla suplementaria 19. Proporción de SA y SS establecidas en cabezas de espinas dendríticas, cuellos de espinas dendríticas, tallos dendríticos sin espinas y tallos dendríticos con espinas en la capa II de la CTE por casos individuales. Entre paréntesis de muestran los valores absolutos.

Caso	Tipo de sinapsis	Sinapsis en cabeza	Sinapsis en cuello	Sinapsis en tallos sin espinas	Sinapsis en tallos con espinas	Nº Total sinapsis
AB1	SA	43.9% (118)	0.7% (2)	33.8% (91)	21.6% (58)	100% (269)
	SS	4.8% (1)	4.8% (1)	42.9% (9)	47.5% (10)	100% (21)
AB3	SA	39.3% (120)	0.7% (2)	29.8% (91)	30.2% (92)	100% (305)
	SS	13.9% (5)	0% (0)	27.8% (10)	58.3% (21)	100% (36)
IF10	SA	47.5% (122)	0.4% (1)	22.1% (57)	30.0% (77)	100% (257)
	SS	10.0% (2)	0% (0)	20.0% (4)	70.0% (14)	100% (20)
M16	SA	63.5% (207)	0.9% (3)	13.8% (45)	21.8% (71)	100% (326)
	SS	0% (0)	0% (0)	30.4% (7)	69.6% (16)	100% (23)
IF1	SA	40.8% (71)	0.5% (1)	25.9% (45)	32.8% (57)	100% (174)
	SS	21.1% (4)	0% (0)	36.8% (7)	42.1% (8)	100% (19)
VK11	SA	46.9% (91)	1.0% (2)	26.8% (52)	25.3% (49)	100% (194)
	SS	13.3% (2)	0% (0)	40.0% (6)	46.7% (7)	100% (15)
VK16	SA	34.7% (26)	4.0% (3)	41.3% (31)	20.0% (15)	100% (75)
	SS	5.3% (1)	0% (0)	57.9% (11)	36.8% (7)	100% (19)
VK22	SA	45.3% (101)	0% (0)	33.2% (74)	21.5% (48)	100% (223)
	SS	6.9% (2)	0% (0)	58.6% (17)	34.5% (10)	100% (29)

Tabla suplementaria 20. Proporción de SA y SS establecidas en cabezas de espinas dendríticas, cuellos de espinas dendríticas, tallos dendríticos sin espinas y tallos dendríticos con espinas en la capa II de la CE por casos individuales. Entre paréntesis de muestran los valores absolutos.

Caso	Tipo de sinapsis	Sinapsis en cabeza	Sinapsis en cuello	Sinapsis en tallos sin espinas	Sinapsis en tallos con espinas	Nº Total sinapsis
AB1	SA	53.8% (170)	1.3% (4)	15.2% (48)	29.7% (94)	100% (316)
	SS	22.6% (7)	3.2% (1)	16.1% (5)	58.1% (18)	100% (31)
AB3	SA	32.4% (110)	0.3% (1)	31.6% (107)	35.7% (121)	100% (339)
	SS	18.8% (6)	6.2% (2)	32.2% (10)	43.8% (14)	100% (32)
IF10	SA	48.7% (182)	1.1% (4)	20.0% (75)	30.2% (113)	100% (374)
	SS	0% (0)	0% (0)	23.1% (6)	76.9% (20)	100% (26)
M16	SA	52.4% (177)	0.9% (3)	15.1% (51)	31.6% (107)	100% (338)
	SS	9.7% (3)	0% (0)	19.3% (6)	71.0% (22)	100% (31)
IF1	SA	51.4% (130)	0.8% (2)	25.7% (65)	22.1% (56)	100% (253)
	SS	2.5% (1)	0% (0)	45.0% (18)	52.5% (21)	100% (40)
VK11	SA	43.3% (78)	1.7% (3)	31.7% (57)	23.3% (42)	100% (180)
	SS	8.3% (1)	8.3% (1)	25.0% (3)	58.4% (7)	100% (12)
VK16	SA	35.4% (29)	1.2% (1)	42.7% (35)	20.7% (17)	100% (82)
	SS	0% (0)	0% (0)	50.0% (1)	50.0% (1)	100% (2)
VK22	SA	48.7% (93)	0.5% (1)	34.6% (66)	16.2% (31)	100% (191)
	SS	10.0% (3)	6.7% (2)	36.7% (11)	46.6% (14)	100% (30)

Tabla suplementaria 21. Proporción de SA y SS establecidas en cabezas de espinas dendríticas, cuellos de espinas dendríticas, tallos dendríticos sin espinas y tallos dendríticos con espinas en la capa III de la CE por casos individuales. Entre paréntesis de muestran los valores absolutos.

Caso	Tipo de sinapsis	Sinapsis en cabeza	Sinapsis en cuello	Sinapsis en tallos
AB1	SA Área (nm ²)	174245±10358	59937±15369	119938±8347
	SS Área (nm ²)	81916±25013	-	74598±11530
	SA Perímetro (nm)	2082±94	1225±270	1604±72
	SS Perímetro (nm)	1394±280	-	1337±131
AB2	SA Área (nm ²)	112533±11621	11260±0	99295±6457
	SS Área (nm ²)	-	19199±0	51188±7124
	SA Perímetro (nm)	1616±107	408±0	1620±70
	SS Perímetro (nm)	-	628±0	1381±146
IF10	SA Área (nm ²)	151118±8925	92641±28972	113730±5022
	SS Área (nm ²)	27156±0	-	84172±10433
	SA Perímetro (nm)	1836±68	1766±289	1528±38
	SS Perímetro (nm)	715±0	-	1436±104
M16	SA Área (nm ²)	125691±6044	129559±71552	127215±5275
	SS Área (nm ²)	82411±7598	-	84257±10139
	SA Perímetro (nm)	1713±61	1751±659	1703±44
	SS Perímetro (nm)	1497±163	-	1535±122
M17	SA Área (nm ²)	156193±9905	-	104825±7475
	SS Área (nm ²)	106317±3382	-	76758±5917
	SA Perímetro (nm)	2071±98	-	1594±71
	SS Perímetro (nm)	1575±16	-	1482±89

Tabla suplementaria 22. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y en tallos dendríticos de la capa II de la CTE del grupo control, por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.

Caso	Tipo de sinapsis	Sinapsis en cabeza	Sinapsis en cuello	Sinapsis en tallos
IF1	SA Área (nm ²)	121857±6593	48071±0	120452±6546
	SS Área (nm ²)	79096±15703	-	84395±9211
	SA Perímetro (nm)	1698±74	1220±0	1582±59
	SS Perímetro (nm)	1332±74	-	1513±107
IF2	SA Área (nm ²)	152560±11671	66327±18333	111851±6340
	SS Área (nm ²)	27249±9148	-	50064±6961
	SA Perímetro (nm)	1828±91.53	1211±148.2	1572±61.31
	SS Perímetro (nm)	759±141	-	1216±105
IF6	SA Área (nm ²)	136983±11088	71094±0	101592±5319
	SS Área (nm ²)	-	-	80408±9544
	SA Perímetro (nm)	1894±119	1231±0	1495±46
	SS Perímetro (nm)	-	-	1444±121
VK11	SA Área (nm ²)	124449±8495	22961±0	136594±8199
	SS Área (nm ²)	-	-	44912±5221
	SA Perímetro (nm)	1823±102	602±0	1869±89
	SS Perímetro (nm)	-	-	1011±72
VK22	SA Área (nm ²)	189130±32008	76077±52463	125449±10907
	SS Área (nm ²)	-	55339±0	61122±8921
	SA Perímetro (nm)	2004±197	1257±403	1608±89
	SS Perímetro (nm)	-	1269±0	1200±101

Tabla suplementaria 23. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y en tallos dendríticos de la capa II de la CTE del grupo con EA, por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.

Caso	Tipo de sinapsis	Sinapsis en cabeza	Sinapsis en cuello	Sinapsis en tallos
AB1	SA Área (nm ²)	116433±7880	62923±26531	97923±5519
	SS Área (nm ²)	51646±0	40544±0	63192±8622
	SA Perímetro (nm)	1723±87	1230±443	1502±57
	SS Perímetro (nm)	1224±0	898±0	1346±151
AB3	SA Área (nm ²)	129388±8173	44316±1345	106727±4317
	SS Área (nm ²)	49618±17364	-	74361±15868
	SA Perímetro (nm)	1826±89	889.4±58	1545±39
	SS Perímetro (nm)	1348±321	-	1642±274
IF10	SA Área (nm ²)	138028±8701	33944±0	108765±5631
	SS Área (nm ²)	41772±4305	-	55371±5475
	SA Perímetro (nm)	2134±112	1205±0	1646±59
	SS Perímetro (nm)	1022±139	-	1381±134
M16	SA Área (nm ²)	123276±6396	72416±9114	124779±5689
	SS Área (nm ²)	37016±3482	74790±0	84963±7388
	SA Perímetro (nm)	1637±59	1327±209	1705±54
	SS Perímetro (nm)	970±97	1580±0	1484±83

Tabla suplementaria 24. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y en tallos dendríticos de la capa II de la CE del grupo control, por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.

Caso	Tipo de sinapsis	Sinapsis en cabeza	Sinapsis en cuello	Sinapsis en tallos
IF1	SA Área (nm ²)	190086±13939	166428±0	162580±9454
	SS Área (nm ²)	40683±3125	-	89884±15029
	SA Perímetro (nm)	2123±112	2785±0	1905±68
	SS Perímetro (nm)	1108±128	-	1543±176
VK11	SA Área (nm ²)	153456±11963	63651±5026	98255±6727
	SS Área (nm ²)	59180±23895	-	56241±7016
	SA Perímetro (nm)	2154±141	1523±372	1598±68
	SS Perímetro (nm)	1302±269	-	1272±95
VK16	SA Área (nm ²)	123221±37041	190418±33655	200109±31045
	SS Área (nm ²)	25923±0	-	46973±6225
	SA Perímetro (nm)	1740±379	1959±189	2263±212
	SS Perímetro (nm)	832±0	-	1074±91
VK22	SA Área (nm ²)	139375±10614	-	104010±5237
	SS Área (nm ²)	46114±4384	-	58907±7871
	SA Perímetro (nm)	1856±97	-	1535±49
	SS Perímetro (nm)	976±12	-	1245±100

Tabla suplementaria 25. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y en tallos dendríticos de la capa II de la CE del grupo con EA, por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.

Caso	Tipo de sinapsis	Sinapsis en cabeza	Sinapsis en cuello	Sinapsis en tallos
AB1	SA Área (nm ²)	136379±7379	67972±4806	109669±5102
	SS Área (nm ²)	37410±7771	71009±0	67148±6213
	SA Perímetro (nm)	1858±81	1336±89	1571±47
	SS Perímetro (nm)	841±109	1294±0	1307±101
AB3	SA Área (nm ²)	145555±10071	312789±0	138062±4343
	SS Área (nm ²)	51182±10913	81399±20620	71518±6416
	SA Perímetro (nm)	2125±124	5005±0	1787±39
	SS Perímetro (nm)	1212±171	1531±324	1517±117
IF10	SA Área (nm ²)	157392±8378	31197±6358	99464±4468
	SS Área (nm ²)	-	-	66973±9666
	SA Perímetro (nm)	2475±118	822±86	1693±68
	SS Perímetro (nm)	-	-	1612±216
M16	SA Área (nm ²)	130994±8334	80509±15837	129048±6638
	SS Área (nm ²)	69547±9128	-	77709±11885
	SA Perímetro (nm)	1825±98	1314±122.3	1819±75
	SS Perímetro (nm)	1405±208	-	1356±147

Tabla suplementaria 26. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y en tallos dendríticos de la capa III de la CE del grupo control, por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.

Caso	Tipo de sinapsis	Sinapsis en cabeza	Sinapsis en cuello	Sinapsis en tallos
IF1	SA Área (nm ²)	161547±10746	95741±8626	136197±7339
	SS Área (nm ²)	50923±0	-	100307±8572
	SA Perímetro (nm)	2192±144	1620±265	1793±67
	SS Perímetro (nm)	1139±0	-	2175±173
VK11	SA Área (nm ²)	191005±16909	124838±57991	118767±7345
	SS Área (nm ²)	48407±0	21593±0	51908±17311
	SA Perímetro (nm)	2400±180	2047±773	1689±87
	SS Perímetro (nm)	1053±0	741±0	1259±326
VK16	SA Área (nm ²)	120047±26848	164890±0	129796±10995
	SS Área (nm ²)	-	-	46515±7167
	SA Perímetro (nm)	1500±134	2399±0	1737±98
	SS Perímetro (nm)	-	-	1103±20
VK22	SA Área (nm ²)	130797±10970	15819±0	86131±5273
	SS Área (nm ²)	34964±7061	16401±2070	40161±3725
	SA Perímetro (nm)	1780±109	770±0	1356±47
	SS Perímetro (nm)	940±77	582±5	1020±75

Tabla suplementaria 27. Datos del área (nm²) y perímetro (nm) de la SAS de las SA y SS establecidas en cabezas y cuellos de espinas dendríticas y en tallos dendríticos de la capa III de la CE del grupo con EA, por casos individuales. Todos los datos han sido corregidos con el factor de encogimiento correspondiente. Los datos del área y del perímetro están expresados como la media±sem.


IX. ANEXO 2: Artículos de investigación

RESEARCH

Open Access



Three-dimensional analysis of synapses in the transentorhinal cortex of Alzheimer's disease patients

M. Domínguez-Álvarez¹, M. Montero-Crespo^{1,2}, L. Blázquez-Llorca^{1,5}, R. Insausti⁴, J. DeFelipe^{1,2,3} and L. Alonso-Nanclares^{1,2,3*} 

Abstract: Synaptic dysfunction or loss in early stages of Alzheimer's disease (AD) is thought to be a major structural correlate of cognitive dysfunction. Early loss of episodic memory, which occurs at the early stage of AD, is closely associated with the progressive degeneration of medial temporal lobe (MTL) structures of which the transentorhinal cortex (TEC) is the first affected area. However, no ultrastructural studies have been performed in this region in human brain samples from AD patients.

In the present study, we have performed a detailed three-dimensional (3D) ultrastructural analysis using focused ion beam/scanning electron microscopy (FIB/SEM) to investigate possible synaptic alterations in the TEC of patients with AD. Surprisingly, the analysis of the density, morphological features and spatial distribution of synapses in the neuropil showed no significant differences between AD and control samples. However, light microscopy studies showed that cortical thickness of the TEC was severely reduced in AD samples, but there were no changes in the volume occupied by neuronal and glial cell bodies, blood vessels, and neuropil. Thus, the present results indicate that there is a dramatic loss of absolute number of synapses, while the morphology of synaptic junctions and synaptic spatial distribution are maintained. How these changes affect cognitive impairment in AD remains to be elucidated.

Keywords: Dementia, Electron Microscopy, FIB/SEM, Medial temporal lobe, Neuropil, Synapses

Introduction

Alzheimer's Disease (AD) is the main cause of dementia, accounting for 60–80% of cases in the adult population [3]. The disease is characterized by a progressive and persistent decline of cognitive functions, such as memory and orientation. In the final stages, patients suffer a severe lack of autonomy and social life [56]. AD is characterized by two hallmark lesions: extracellular amyloid plaques, primarily consisting of amyloid- β (A β) peptide, and intracellular neurofibrillary tangles, which consist of filamentous aggregates of hyperphosphorylated tau protein. In addition to these main hallmarks of AD, other neuropathological changes—such as neuronal and synaptic loss—have also been described [58]. Among them, synaptic loss seems to be the major structural correlate

of cognitive decline observed in AD patients, and it is considered to be the earliest mechanism that precedes neuronal loss [5, 18, 23, 43, 70, 82].

Even though it seems that AD begins in subcortical regions [12, 13, 15], the early loss of episodic memory is closely associated with the progressive degeneration of the medial temporal lobe (MTL) structures [71]. Among the MTL structures, the transentorhinal cortex (TEC) is one of the first affected areas [11]. This obliquely oriented cortex is located in the MTL between the perirhinal cortex (PRC) and the entorhinal cortex (EC) [10, 14]. The TEC is considered as a transitional zone between the periallocortex represented by EC and the proisocortex [10, 14, 36]. Although the TEC is not considered as a distinct area in Brodmann's nomenclature, it is nonetheless part of area 35 (perirhinal cortex), which—together with Brodmann's area 36 (entorhinal cortex)—is nowadays frequently named perirhinal cortex (PRC) [42].

Obvious ethical reasons prevent tract-tracing connectivity studies on human brain other than in post-mortem

* Correspondence: aidil@cajal.csic.es

¹Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain

²Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avda Doctor Arce, 37, 28002 Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



studies; however, studies performed in monkey have shown that the PRC constitutes a convergence zone, receiving two main inputs. First, it connects extensively with MTL structures, including (in order of decreasing strength): EC, parahippocampal cortex, amygdala and hippocampus. Secondly, it has connections with cortical association areas (visual, insula, temporal, cingulate and orbitofrontal) [79, 81]. One of the main MTL reciprocal connections is established with the EC: inputs terminate in layer II and layers V–VI of the PRC (area 35 and the medial portion of area 36) [80, 81], while the main output of PRC is directed to layer I and III of the EC [35]. These strong interconnections make PRC unique, occupying a key position where sensory information converges with other information from memory-related structures, integrating memory information [78, 81]. Furthermore, it has been reported that neurons in layer II of the TEC are affected by neurofibrillary degeneration in primary age-related tauopathy [11, 72]. Thus, investigating the changes that affect synaptic connectivity in the TEC, as an early affected area in AD, is essential to better understand the mechanisms underlying this disease. As far as we know, no detailed ultrastructural studies have been performed in the human TEC.

Therefore, in order to investigate possible microanatomical changes related to this pathological condition, we performed an ultrastructural study of layer II neuropil of the TEC in human brain samples from AD patients and subjects with no apparent neurological alterations. We used focused ion beam/scanning electron microscopy (FIB/SEM) and three-dimensional (3D) reconstructions [45] to determine the density, types and features of the synapses, as well as their spatial distribution. Moreover, since it has been reported that there is a reduction in the thickness of frontal cortex, temporal cortex (areas 21 and 22 of Brodmann) and in the molecular layer of dentate gyrus (DG) in AD patients [59, 60, 63, 69], light microscopy studies were performed to evaluate the decrease in TEC thickness. Additionally, the same TEC samples were examined with light microscopy to investigate the volume occupied by neurons, glia, blood vessels and neuropil in both control and AD patients.

Materials and methods

Tissue preparation

Human brain tissue was obtained from three sources: Pathological Anatomy Service of Bellvitge University Hospital (Barcelona, Spain), *Centro Alzheimer Fundación Reina Sofía*, CIEN Foundation (Madrid, Spain) and Human Neuroanatomy Laboratory, School of Medicine, University of Castilla-La Mancha (Albacete, Spain).

Samples were obtained from five subjects with no apparent neurological alterations and from five patients with AD. According to the neuropathological criteria

provided by the above-mentioned centers, cases were classified as control (subjects with no apparent neurological alterations) or AD (Table 1). Brain tissue samples were obtained following the guidelines and approval of the Institutional Ethical Committee. In all cases, the time between death and tissue processing was lower than 4 h.

Upon removal, brain tissue was fixed in cold 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB; Panreac, No.131965, Spain) pH 7.4 for 24–48 h. After fixation, the tissue was washed in PB and sectioned coronally in a vibratome (Vibratome Sectioning System, VT1200S Vibratome, Leica Biosystems, Germany).

Immunohistochemistry

Selected sections were first rinsed in PB 0.1 M, pre-treated in 2% H₂O₂ for 30 min to remove endogenous peroxidase activity, and then incubated for 1 h at room temperature in a solution of 3% normal horse serum (for polyclonal antisera and monoclonal antibodies, respectively; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) and 0.25% Triton-X (Merck, Darmstadt, Germany). Subsequently, sections were incubated for 48 h at 4 °C in the same solution with mouse anti-NeuN (1:2000; Chemicon; MAB377, Temecula, CA, USA) and anti-human PHF-Tau antibody clone AT8 (1:2000, MN1020, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA); for the sake of clarity, we will refer to this as anti-PHF-Tau-AT8. Sections selected for anti-A β were first treated with 88% formic acid (Sigma-Aldrich, No. 251364, St. Louis, MO, USA) to ensure specific plaque immunostaining, and were then incubated in a solution containing mouse antibody anti-A β (clone 6F/3D; 1:50, Dako M0872, Glostrup, Denmark). Sections were then processed with a secondary biotinylated horse anti-mouse IgG antibody (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), and then incubated for 1 h in an avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain ABC Elite PK6100, Vector) and, finally, with the chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Finally, sections were dehydrated, cleared with xylene and cover-slipped.

Electron microscopy

Sections containing TEC were selected (Figs. 1, 2, and 3; Table 1) and postfixated for 24 h in a solution containing 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde (TAAB, G002, UK) and 0.003% CaCl₂ (Sigma, C-2661-500G, Germany) in sodium cacodylate (Sigma, C0250-500G, Germany) buffer (0.1 M). These sections were washed in sodium cacodylate buffer (0.1 M) and treated with 1% OsO₄ (Sigma, O5500, Germany), 0.1% potassium ferrocyanide (Probus, No. 23345, Spain) and 0.003% CaCl₂ in sodium

Table 1 Clinical and neuropathological information

Patient	Gender	Age (years)	Cause of death	Postmortem delay (h)	Braak Stage	CERAD Stage	Neuropsychological diagnosis
AB1	Male	45	Lung cancer	< 1	NA	NA	NA
AB2	Female	53	Pulmonary shock	4	NA	NA	NA
IF10	Male	66	Bronchopneumonia plus cardiac failure	2	NA	NA	NA
M16	Male	40	Traffic accident	3	NA	NA	NA
M17	Male	36	Bronchopneumonia	2.5	NA	NA	NA
IF1	Female	80	–	2	IV	B	No evidence of cognitive impairment and dementia
IF2	Female	94	Pulmonary tuberculosis	1.5	V	C	Dementia
IF6	Male	85	Pneumonia	2	III	A	Mild cognitive impairment
VK11	Female	87	Respiratory inflammation	1.5	III–IV	A	Dementia
VK22	Female	86	–	2	V	C	Dementia

NA Not applicable, NFTs neurofibrillary tangles, – Not available

Braak Stages [11]: III (NFTs in entorhinal cortex and closely related areas); III–IV (NFTs abundant in amygdala and hippocampus. Extending slightly into association cortex); V–VI (NFTs widely distributed throughout the neocortex and ultimately involving primary motor and sensory areas). CERAD Stages [48]: A (Low density of neuritic plaques); B (Intermediate density of neuritic plaques); C (High density of neuritic plaques)

cacodylate buffer (0.1 M) for 1 h at room temperature. After washing in PB, sections were stained with 2% uranyl acetate (EMS, 8473, USA), and then dehydrated and flat-embedded in Araldite (TAAB, E021, UK) for 48 h at 60 °C [20]. Embedded sections were glued onto a blank Araldite block and trimmed. Semithin sections (1–2 µm thick) were obtained from the surface of the block and stained with 1% toluidine blue (Merck, No.115930, Germany) in 1% sodium borate (Panreac, No. 141644, Spain). The last semithin section (which corresponds to the section immediately adjacent to the block surface) was examined under light microscope and photographed to accurately locate the neuropil regions to be examined.

Tissue shrinkage estimation

Tissue shrinkage due to electron microscopy processing was estimated measuring the area before and after processing to correct the final values in both control and AD cases [45]. The area after processing was divided by the area value measured before processing, to obtain a shrinkage factor for any area measurement (p^2) of 0.933.

Moreover, to estimate differences between control and AD cases, we measured the cortical thickness of TEC in three to five toluidine blue-stained semithin sections from all cases, obtained in the coronal plane of the cortex and containing the entire cortex, from the pial surface to the white matter. Measurements of the distance between the pial surface and the boundary with the white matter were performed with the aid of Fiji program (ImageJ 1.51; NIH, USA; <http://imagej.nih.gov/ij/>).

To average data, three measurements were made per section.

In addition, FIB/SEM stacks of images were also corrected for the presence of fixation artifacts, which did not affect the proper identification and quantitation of synapses, i.e., swollen neuronal or glial processes. The volume occupied by these artifacts, calculated applying the Cavalieri principle [30], was discounted from the volume of the stacks of images to avoid under-estimation of the number of synapses per volume. Every FIB/SEM stack was examined and the volume artifact ranged between 3 and 33% of the volume stacks. Data on the number of synapses per volume were corrected accordingly.

Volume fraction estimation of cortical elements

Three to five semithin sections (1–2 µm thick) from all cases stained with toluidine blue were used to estimate the respective volume fractions occupied by (i) neuropil, (ii) cell bodies (from neurons and glia) and (iii) blood vessels. This estimation was performed applying the Cavalieri principle [30] by point counting using the integrated Stereo Investigator stereological package (Version 8.0, MicroBrightField Inc., VT, USA) attached to an Olympus light microscope (Olympus, Bellerup, Denmark) at 40× magnification. A grid, whose points covered an area of 400µm², was overlaid over each semithin section to determine the volume fraction (V_v) occupied by the different elements: neurons, glia, blood vessels and neuropil (Additional file 1: Figure S1A). V_v was estimated with the following formulae: V_v neuropil = 100 - (V_v neurons + V_v glia + V_v blood vessels).

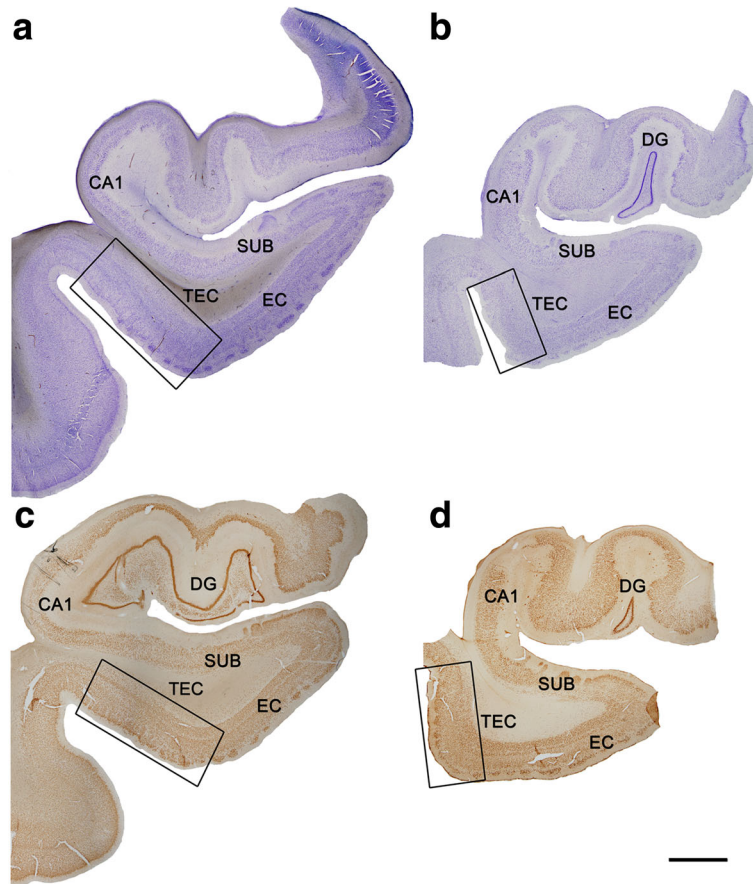


Fig. 1 Coronal sections of human hippocampal formation. Low-power photographs of a control subject (**a, c**) and an AD patient (**b, d**), in sections stained for Nissl (**a, b**) and immunostained for anti-NeuN (**c, d**). TEC is indicated by the box. Scale bar (in **d**): 3 mm

Three-dimensional electron microscopy

The 3D study of the samples was carried out using a dual beam microscope (Crossbeam® Neon40 EsB, Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany). This instrument combines a high-resolution field-emission SEM column with a focused gallium ion beam (FIB), which permits removal of thin layers of material from the sample surface on a nanometer scale. As soon as one layer of material is removed by the FIB (20 nm thick), the exposed surface of the sample is imaged by the SEM using the backscattered electron detector. The sequential automated use of FIB milling and SEM imaging allowed us to obtain long series of photographs of a 3D sample of selected regions [45]. Image resolution in the xy plane was 5 nm/pixel. Resolution in the z axis (section thickness) was 20 nm, and image size was 2048 × 1536 pixels. Although the resolution of FIB/SEM images can be increased, we have chosen these parameters as a compromise solution to obtain a large enough field of view where synaptic junctions could still be clearly identified, in a period of time that allowed us to have long series of sections in a relatively short, reasonable time

(approximately 12 h per stack of images). The number of sections per stack ranged from 149 to 472, which corresponds to a corrected volume ranging from 260.2 to 824.4 μm^3 (mean: 471.3 μm^3). A total of 30 stacks of images of the neuropil from layer II of the TEC were obtained (three stacks per case, in all 10 cases; total volume studied: 14,140 μm^3).

Synaptic three-dimensional analysis

Stacks of images obtained by the FIB/SEM were analyzed using EspINA software (*EspINA Interactive Neuron Analyzer*, 2.1.9; <http://cajalbbp.cesvima.upm.es/espina/>), which allows the segmentation of synapses in the reconstructed 3D volume (for a detailed description of the segmentation algorithm, see [49]; Fig. 4). Since the synaptic junctions were fully reconstructed as described elsewhere [45], each synapse could be classified as asymmetric (AS) or symmetric (SS) based on its prominent or thin post-synaptic density (PSD: Additional file 1: Figure S2), respectively [29, 53].

EspINA provided the number of synapses in a given volume, which allows the estimation of the number of

synapses per volume. EspINA also allowed the application of an unbiased 3D counting frame to perform direct counting (for details, see [45]).

In addition, geometrical features —such as size and morphology— and spatial distribution features (centroids) of each reconstructed synapse were also calculated by EspINA. This software also extracts the Synaptic Apposition Surface (SAS) and provides its morphological properties. Since the pre- and post-synaptic densities are located face to face, their surface areas are comparable (for details, see [50]). Since the SAS adapts to the curvature of the synaptic junction we have also measured its curvature as one minus the ratio between the projected area of the SAS and the area of the SAS. This measurement would be 0 in a flat SAS, and would increase to a maximum of 1 as the SAS curvature increases. Since the SAS comprises both the active zone and the PSD, it is a functionally relevant measure of the size of a synapse (Fig. 4) [50].

Spatial distribution analysis of synapses

To analyze the spatial distribution of synapses, Spatial Point Pattern analysis was performed as described elsewhere [4, 46]. Briefly, we compared the actual position of centroids of synapses with the Complete Spatial Randomness (CSR) model — a random spatial distribution model which defines a situation where a point is equally likely to occur at any location within a given volume. For each of the 30 different samples, we calculated three functions commonly used for spatial point pattern analysis: G, F and K functions (for a detailed description, see [9]). An additional step to explore the spatial distribution of a spatial pattern is to obtain the distance to the nearest neighbor. To do this, the distance of each synapse to its nearest synapse was measured, and comparison between control and AD patients was also performed. This study was carried out using the Spatstat package and R Project program [6].

Statistical analysis

To determine possible differences between groups, statistical comparisons of synaptic density, proportion of synapses, TEC thickness, synaptic size (SAS), neuronal and glial cell bodies, blood vessels and neuropil volume fraction, as well as the distance to the nearest neighbor were carried out using the unpaired Mann-Whitney (MW) nonparametric U-test (the normality and homoscedasticity criteria were not met). Frequency distribution analysis of the SAS was performed using Kolmogorov-Smirnov (KS) nonparametric test. Statistical studies were performed with the aid of the GraphPad Prism statistical package (Prism 5.00 for Windows, GraphPad Software Inc., USA) and SPSS program (IBM SPSS Statistics v22, IBM Corp., USA).

Results

Histopathological findings

The TEC region was delimited on the basis of previous studies [10, 14]. In Nissl-stained sections and sections immunostained for anti-NeuN, the TEC was distinguished because layers III and V merge and sweep obliquely to invade layer II of the EC [10, 14, 24, 85]. TEC is considered as part of the PRC area 35. PRC is proisocortex [36] and lacks a layer IV (agranular type of cortex). The most typical feature of TEC is the presence of an oblique band of neurons between layers V and III [24, 37] of PRC. Standard histopathological assessment of all cases was performed on Nissl-stained and NeuN-immunostained sections containing the TEC. AD cases showed an apparent reduction in the total volume of MTL structures, including TEC (Figs. 1, 2). In addition, immunostaining for anti-PHF-Tau and anti-A β revealed the presence of a variable amount of immunoreactive PHF-Tau neurons and A β -plaques in the AD cases, whereas in control cases no A β -plaques were found and only occasional PHF-Tau neurons were present (Figs. 1, 2, and 3; Table 1).

To evaluate the degree of reduction, measurements of the whole thickness of TEC were performed in toluidine blue-stained semithin sections. These results revealed a significantly lower thickness of the TEC (35% lower) in AD patients compared to controls (MW, $p = 0.02$; Table 2; Additional file 1: Table S1); its average thickness was 1.74 mm in AD patients versus 2.66 mm in control subjects.

Volume fraction of cortical elements

To estimate the possible degree of neuronal loss in the TEC in AD patients, the V_v was estimated for neurons, glia, blood vessels and neuropil. In control subjects, the volumes occupied by neuronal somata, glia somata, blood vessels and neuropil were 7.17%, 0.50%, 3.28% and 89.05%, respectively. In AD patients, these volumes were 5.86%, 0.35%, 3.71% and 90.08%, respectively. There was no significant difference between control and AD cases (MW, $p > 0.05$; Table 2; Additional file 1: Figure S1; Additional file 1: Table S1).

Synaptic density

To compare synaptic features between control subjects and AD patients, synapses were examined in the neuropil from layer II of TEC (i.e., avoiding the cell bodies of neurons as well as glial and blood vessels; Additional file 1: Figure S2) [22]. In order to assure that FIB/SEM sampling was obtained from the same cortical layer, all the samples (from both control and AD subjects) were taken below the first row of neurons beneath layer I at a distance of approximately 267.03–506.10 μm from the

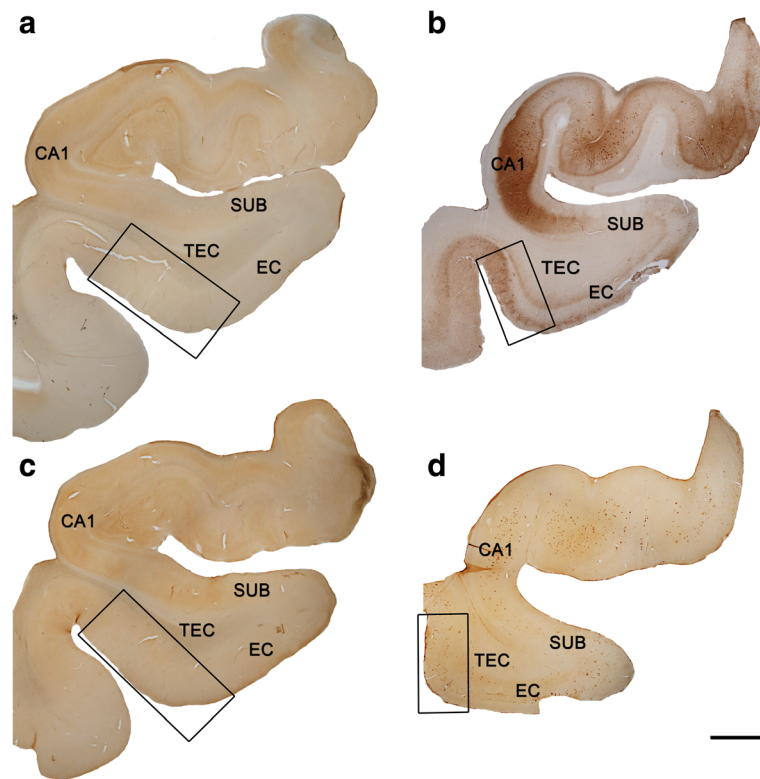


Fig. 2 Coronal sections of human hippocampal formation. Low-power photographs of a control subject (**a, c**) and an AD patient (**b, d**), in sections immunostained for anti-PHF-Tau-AT8 (**a, b**) and anti-A β (**c, d**). TEC is indicated by the box. Immunostaining for anti-PHF-Tau-AT8 (**b**) and anti-A β (**d**) can be observed in the AD patient. These neuropathological marks are absent in the control subject (**a, c**). Scale bar (in **d**): 3 mm

surface. We refer to this as layer II regardless of whether or not layer III was distinguished.

A total of 6102 synapses were identified; of these, 4646 synapses were analyzed—after discarding incomplete ones and those excluded by the counting frame—of which 2656 synapses were from control subjects (total tissue volume analyzed 5295 μm^3), and 1990 were from AD patients (total tissue volume analyzed 5266 μm^3) (Table 3, Additional file 1: Table S2). The number of synapses per volume was calculated by dividing the total number of synapses by the volume of the counting frame. Although values were lower in AD patients, we did not find significant differences in synaptic density (MW, $p = 0.22$) between control subjects (range: 0.41–0.75 synapses/ μm^3) and AD patients (range: 0.16–0.49 synapses/ μm^3 ; Fig. 5; Table 3, Additional file 1: Table S2).

For practically all synaptic junctions found in control and AD patients, 3D segmentation allowed unambiguous classification into AS (prominent PSD) and SS (thin PSD) [29, 53, 54]. The proportion of each type of synapse was 95.64% (AS) and 4.36% (SS) in control subjects, and 94.47% and 5.53%, respectively, in AD patients (Table 3, Additional file 1: Table S2). Hence, no significant differences in proportions between control subjects

and AD patients (MW, $p = 0.15$) were observed. Thus, the proportion of AS (excitatory) and SS (inhibitory) remained unchanged in layer II from TEC originating from AD patients.

Synaptic morphology: Synaptic apposition surface (SAS)

Synaptic morphological analysis was performed by extracting the SAS from each synapse [50]. SAS features such as the area, the perimeter and the curvature showed no significant differences between groups, and this was the case for both AS and SS (MW, $p > 0.05$; Table 4, Additional file 1: Table S3). Frequency distribution analysis did not reveal significant differences either (KS, $p > 0.05$; Additional file 1: Figure S3). Values of SAS fitted to a log-normal distribution in both cases (Additional file 1: Figure S3). In summary, AD does not seem to affect the shape and size of the synaptic junctions.

Synaptic distribution: 3D spatial analysis

To analyze the spatial distribution of synapses, we compared the actual position of the centroids of synaptic junctions with the CSR model. A random distribution follows the basic reference model of a CSR point process or homogeneous spatial Poisson point

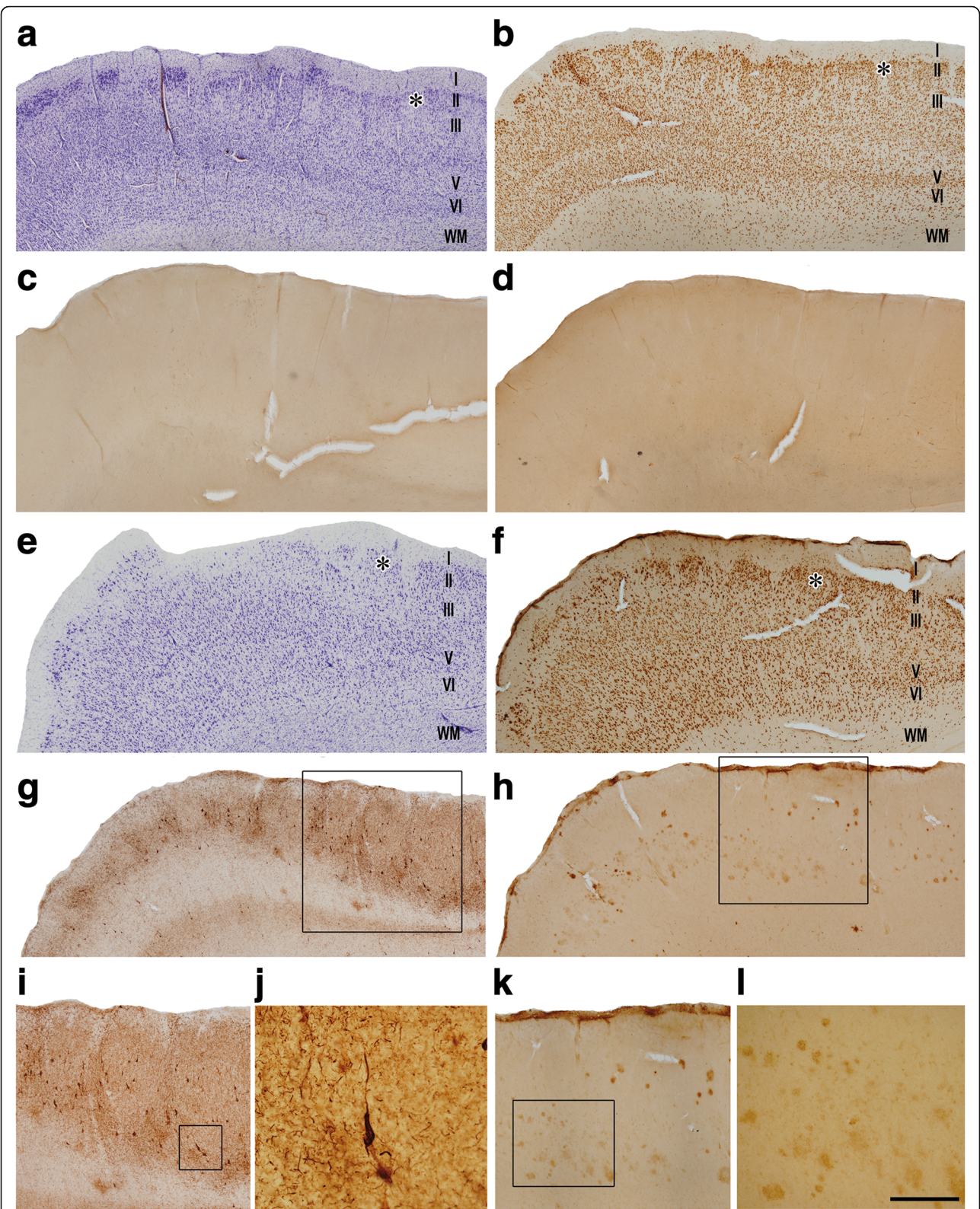


Fig. 3 Higher magnifications of human TEC in coronal sections. Series of photomicrographs from a control subject (**a–d**) and an AD patient (**e–l**). Sections are stained for Nissl (**a, e**), and immunostained with antibodies anti-NeuN (**b, f**), anti-PHF-Tau-AT8 (**c, g, i, j**) and anti-Aβ (**d, h, k, l**). PHF-Tau-AT8 positive neurons (**g, i, j**) and Aβ positive plaques (**h, k, l**) are observed in TEC from the AD patient. Scale bar (in panel **l**) corresponds to: 1 mm in panels **a–d**; 800 μm in panels **e–h**; 530 μm in panels **i** and **k**; 110 μm in panel **j**, and 220 μm in panel **l**

Table 2 Volume fraction occupied by cortical elements in layer II of the TEC. All volume data are corrected for shrinkage

Group	V_{neu} (%; mean \pm SD)	V_g (%; mean \pm SD)	V_{bv} (%; mean \pm SD)	V_n (%; mean \pm SD)	TEC thickness (mm; mean \pm SD)
Control	7.17 \pm 0.98	0.50 \pm 0.14	3.28 \pm 0.41	89.05 \pm 1.22	2.66 \pm 0.37
Alzheimer	5.86 \pm 0.84	0.35 \pm 0.12	3.71 \pm 0.48	90.08 \pm 1.22	1.74 \pm 0.39

SD standard deviation, TEC transentorhinal cortex, V_{neu} volume fraction occupied by neurons, V_g volume fraction occupied by glia, V_{bv} volume fraction occupied by blood vessels, V_n volume fraction occupied by neuropil

The data for individual cases are shown in Additional file 1: Table S1

process. We calculated the G, F and K functions for the 30 samples from controls ($n = 15$) and AD patients ($n = 15$), comparing each one with 100 simulations of the CSR model. Results from these comparisons indicated a clear fit of the samples to a CSR model, since G, F and K functions closely resembled the theoretical curve that represents these functions of a homogeneous Poisson process, both in control subjects and in AD patients (Additional file 1: Figure S4). Note that in the G function there is a dead space (indicated with an arrow) due to the fact that synapses cannot be too close to each other since they cannot overlap in space.

In addition to the location of synapses in each sample, we measured the distance of each synapse to its nearest synapse. The mean distance to its nearest neighbor measured between centroids of synaptic junctions was 791.54 nm in control subjects and 881.50 nm in AD patients. No significant differences between groups (MW, $p = 0.42$; Table 3, Additional file 1: Table S2) were found.

Therefore, our analysis indicates that, the spatial organization of synapses in the neuropil of layer II of the TEC corresponds to a random distribution, regardless of the type of sample (control subjects or AD patients).

Discussion

There were two main findings in the present study. First, at the light microscope level, we found that cortical thickness of the TEC displayed a severe reduction in AD patients, whereas no differences were observed in the volume occupied by neuronal and glial cell bodies, blood vessels and neuropil. Second, at the ultrastructural level, the analysis of the density,

morphological features and spatial distribution of synapses in 3D electron microscope samples of layer II TEC neuropil from control and AD human brain samples showed no significant differences between groups.

Our data were derived from only five control cases and five AD patients. Therefore, the data obtained in the present study cannot be extrapolated to the whole population of patients with AD. However, although we examined relatively few cases, FIB/SEM samples do allow an unprecedented number of large stacks of serial ultrastructural images to be obtained from the neuropil, which provides 3D reconstructions of synapses to accurately determine their density, types, morphological features and spatial distribution in the human brain. Thus, the present results should be considered as robust data that should be verified in more cases and brain areas.

Volume occupied by cortical elements: Loss of cells

No significant differences were found regarding the volume occupied by different cortical elements between AD and control cases. In particular, the volume fraction occupied by neurons was 7.17% in control samples and 5.86% in AD. However, considering the severe reduction of TEC thickness, the total number of neurons in AD patients would be expected to be lower than in control cases. That is, since the cortical thickness in AD patients is 35% thinner than in controls, and, in addition, we did not observe significant changes in the neuronal size in AD samples, the total number of neurons must be dramatically reduced. These results are in line with previous studies in the EC of AD patients reporting a loss of neurons [28, 86]. Similarly, a reduction of cortical thickness in AD has been previously reported in frontal cortex, in areas 21 and 22 of Brodmann, as well as in the

Table 3 Accumulated data obtained from the ultrastructural analysis of neuropil from layer II of the TEC. All volume data are corrected for shrinkage factor

Group	No. AS synapses	No. SS synapses	No. all synapses	% AS Synapses (mean \pm SD)	% SS Synapses (mean \pm SD)	CF volume (μm^3)	No. AS synapses/ μm^3 (mean \pm SD)	No. SS synapses/ μm^3 (mean \pm SD)	No. synapses/ μm^3 (mean \pm SD)	Distance to nearest neighbor (nm; mean \pm SD)
Control	2545	111	2656	95.64 \pm 1.24	4.36 \pm 1.24	5295	0.49 \pm 0.14	0.02 \pm 0.01	0.51 \pm 0.14	791.54 \pm 74.47
Alzheimer	1887	103	1990	94.47 \pm 0.72	5.53 \pm 0.72	5266	0.35 \pm 0.14	0.02 \pm 0.01	0.37 \pm 0.15	881.50 \pm 129.37

All includes AS+SS synapses, AS asymmetric synapses, No. number, SD standard deviation, SS symmetric synapses

The data for individual cases are shown in Additional file 1: Table S2

Table 4 Area (nm²), perimeter (nm) and curvature (ratio) of the SAS. All data are corrected for shrinkage factor

Group	Type of synapse	Area of SAS (nm ² ; mean ± sem)	Perimeter of SAS (nm; mean ± sem)	Curvature of SAS (mean ± sem)
Control	AS	117,800 ± 1957	1653 ± 18.94	0.049 ± 0.001
	SS	76,190 ± 4082	1423 ± 49.14	0.050 ± 0.004
Alzheimer	AS	123,200 ± 2327	1697 ± 22.96	0.049 ± 0.001
	SS	67,750 ± 3611	1284 ± 41.00	0.049 ± 0.003

AS asymmetric synapses, sem standard error of the mean, SAS synaptic apposition surface, SS symmetric synapses
The data for individual cases are shown in Additional file 1: Table S3

molecular layer of DG [59, 60, 63, 69]. The reduction of TEC thickness observed in the present study was apparently unrelated to the abundance of NFTs and Aβ plaques, since patient IF1 showed a TEC thickness close to control values, but abundant NFTs and Aβ plaques in TEC (Figs. 2, 3), similar to other AD patients that showed a clear reduction in the TEC thickness. Further studies with additional AD patients would be necessary to assert the correlation between the TEC thickness and the presence of NFTs and Aβ plaques.

Synaptic changes related to AD

Analysis of neuropil in the stacks of images of layer II of the TEC revealed that AD patients did not show a significantly lower synaptic density. However, since we found that TEC thickness in AD patients was 35% thinner than in control subjects, it follows that a decrease in the total number of synapses in AD occurs in this region. Previous studies performed in both AD patients and in animal models using light or electron microscopy to identify synapses—light microscopy immunocytochemical labeling of synaptic markers (mostly used in studies of human brains) or identification of synaptic junctions at the electron microscope level (see below)—have reported a loss of synapses per volume in the molecular layer of DG, CA1, temporal and cingulate gyrus, as well as in others regions of neocortex [2, 61, 62, 64–67]. However, other studies found an increase in synaptic density in neocortex and hippocampus from APP/PS1 mice [38], or no alterations in EC from AD patients [68]. Discrepancies might be attributable to specific characteristics of the animal models, or features of the analyzed regions, such as those that may be due to sampling differences. For example, near Aβ plaques there is a reduction in the number of synapses [25] and the density of plaques depends on several factors such as the animal model used and the age of the animals. Moreover, it is common to estimate synaptic density indirectly by counting—at the light microscopic level—immunoreactive puncta using synaptic markers [34, 44]. Quantification of synaptic density in single ultrathin sections using transmission electron microscopy to infer 3D characteristics of synaptic junctions observed in two dimensions [64] could be inaccurate for synaptic density

estimations depending on the stereological method and other technical constraints (for further discussion, see [22, 45]). FIB/SEM technology has been proved to be an excellent tool to study the ultrastructure and alterations of synaptic organization of the human brain [8]. Using this technique, we were able to fully reconstruct synaptic junctions in a 3D volume of tissue, thus making possible the identification and classification of all synaptic junctions as AS or SS—thereby solving the technical limitations of other methodologies and obtaining more accurate data about the density of synapses [45]. Thus, the present results indicate that there is not a reduction in the number of synapses per volume of neuropil but—given that there is a decrease in thickness of TEC—it is obvious that there is a decrease in the *absolute* number of synapses in AD patients.

Nevertheless, we did not find differences in the proportion of AS and SS, suggesting that, in the neuropil, there is not an imbalance between excitatory and inhibitory circuits in layer II of the TEC. Since the reduction in the absolute number of synapses affected AS and SS equally, and in the cortex the majority of synapses are AS, the major decrease might be due to the loss of AS. It is well known that AS are mostly formed with dendritic spines of pyramidal cells [21]. This suggests that it is likely that dendritic spine disconnection or dendritic spine loss in the TEC of AD patients occurs. Our results are in agreement with the previously reported alterations of dendritic spines in AD patients [40, 47, 55]. However, since our data are derived from the study of the neuropil, we cannot rule out alterations in the axo-somatic or axo-axonic synapses (i.e., changes in the number, size and shape).

Synaptic changes observed in AD have been proposed to occur during early phases of the disease in subcortical regions and TEC, as these regions represent the areas that are first altered, particularly affecting the monoaminergic system [11, 12, 72]. However, since most AD patients examined in the present study correspond to advanced stages of the diseases, we do not know when the synaptic loss occurred. Aβ peptides and tau proteins play normal roles at the synapse, but under pathological conditions, they may produce toxic effects at both pre- and post-synaptic elements, leading to synaptic loss and

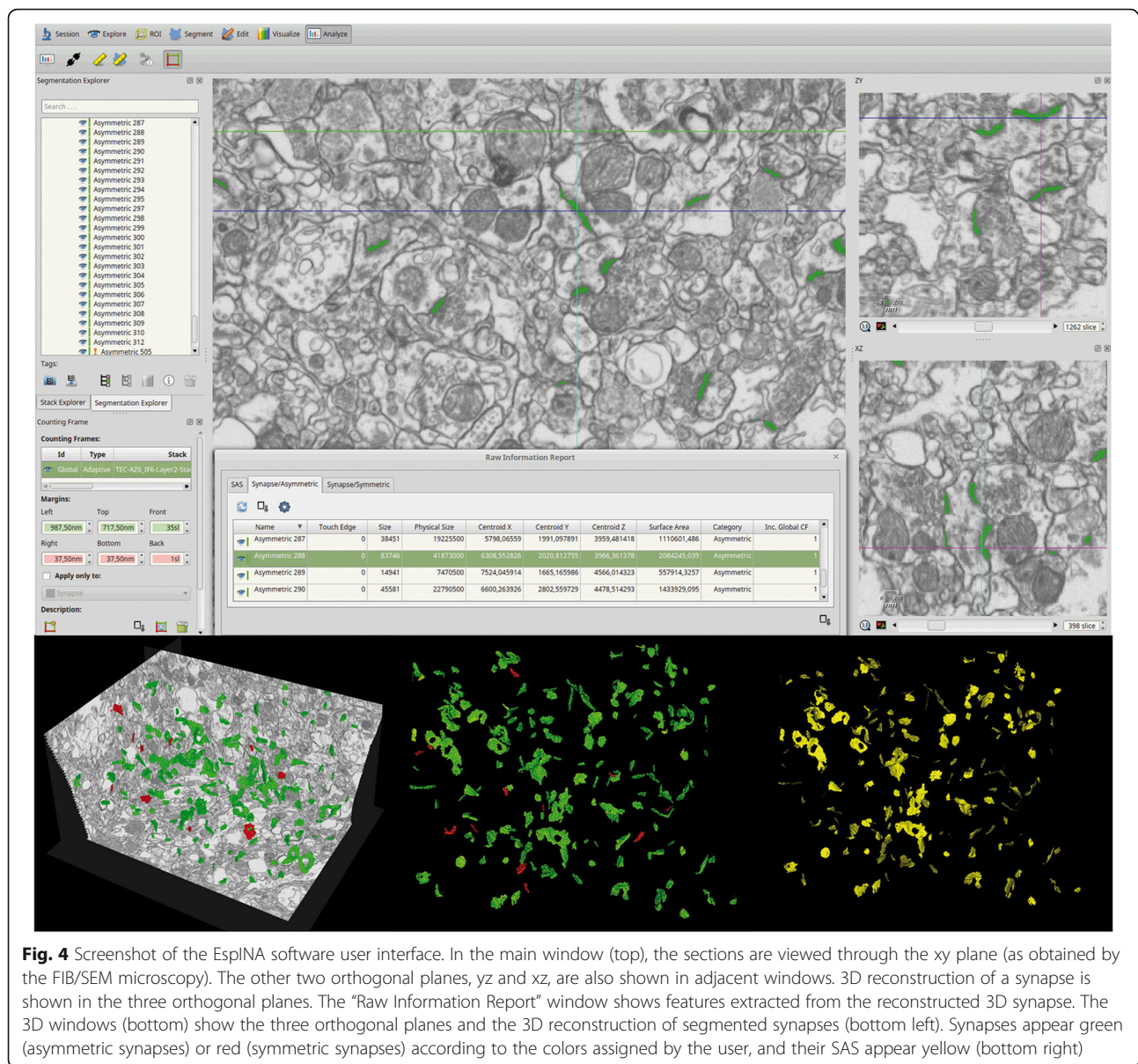


Fig. 4 Screenshot of the EspINA software user interface. In the main window (top), the sections are viewed through the xy plane (as obtained by the FIB/SEM microscopy). The other two orthogonal planes, yz and xz, are also shown in adjacent windows. 3D reconstruction of a synapse is shown in the three orthogonal planes. The “Raw Information Report” window shows features extracted from the reconstructed 3D synapse. The 3D windows (bottom) show the three orthogonal planes and the 3D reconstruction of segmented synapses (bottom left). Synapses appear green (asymmetric synapses) or red (symmetric synapses) according to the colors assigned by the user, and their SAS appear yellow (bottom right)

causing dysfunction in neurotransmitter release [25, 32, 57, 73, 89]. Association of A β oligomers with synaptic structures in AD has been related to alterations in both synapses and dendritic spines [31, 39, 87]. Further analysis of the identity of post-synaptic elements (i.e., dendritic spines versus dendritic shafts) in layer II of the TEC is necessary in order to elucidate whether there are changes in the synaptic targets due to AD.

Synaptic changes and interindividual variability

Despite the results regarding decrease in the number of synapses, it is important to note that there was remarkable interindividual variability. Technical effects were ruled out given that the postmortem delays were all similar and the procedures used were the same.

We found that, in particular, two AD patients (IF6, VK11) showed synaptic density values similar to control subjects. According to the neuropathological criteria, these two patients presented NFTs only in the hippocampus and a low density of plaques (Braak/CERAD stage: III/A). By contrast, the AD patient who had the lowest synaptic density (VK22) presented NFTs widely distributed throughout the neocortex and a high density of plaques (Braak/CERAD stage: V/C). Thus, variability in synaptic density may be related to differences in the disease progression, that is, the more pathological signs, the less synaptic density. However, we also found differences in the synaptic density in AD cases with similar stages (Braak/CERAD stage: V/C), such as IF2 and VK22, whose

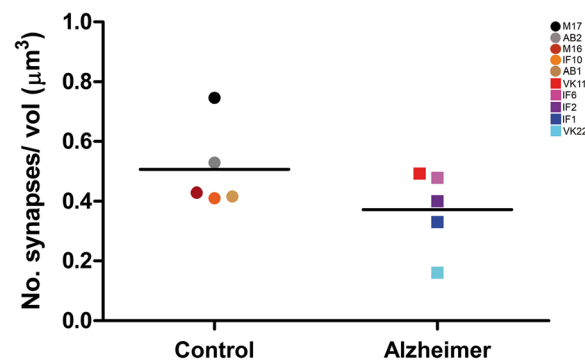


Fig. 5 Graph showing the overall mean synaptic density in control and AD patients. Control cases are represented by circles and AD cases are represented by squares. Each color corresponds to each case analyzed in the study, as denoted in the upper right corner. No significant differences were found between groups (p -value > 0.05)

synaptic densities were $0.40 \text{ synapses}/\mu\text{m}^3$ and 0.16 , respectively. In this regard, cognitive reserve has been proposed to account for the disjunction between the degree of brain pathology and its clinical manifestations [74]. This concept relies on the idea that individual differences in task processing may allow some individuals to cope better than others with brain changes, in general, including AD-related changes [75, 76]. Interestingly, case IF1 (Braak/CERAD stage: IV/B) apparently did not display cognitive impairment and, although its synaptic density was relatively low ($0.33 \text{ synapses}/\mu\text{m}^3$), the TEC had a greater thickness (2.3 mm) than cases with cognitive impairment. As pointed out by Ferrer [26], it should be kept in mind that AD—at least limited to the EC and TEC (stages I–II)—affects about 80% of individuals over 65 years, but dementia only occurs in a small percentage of individuals at this age (the prevalence of dementia in AD increases to 25% in 80-year-old individuals). Thus, it is possible that this particular case (IF1) may represent a pre-dementia stage of AD (prodromal AD) [26].

Nevertheless, there is an ongoing debate about the relationship of hyperphosphorylated-tau protein and the cognitive deficits in AD [16], due to the fact that the basic mechanism or mechanisms of cognitive deterioration are still not well understood.

In a previous study assessing the possible alterations to dendritic spines in pyramidal cells from AD patients [47], a remarkable loss of dendritic spines from pyramidal cells depending on the state of neurofibrillary pathology was found: in the so-called putative ‘pre-tangle’ stage, the dendritic trees of pyramidal neurons were unchanged. In the presence of well-developed NFTs, however, dendritic spine loss was obvious. In cases with an intermediate state of neurofibrillary pathology, the loss of dendritic spines was more variable. Since pyramidal neurons represent the principal building blocks of the cerebral cortex and

dendritic spines are the main post-synaptic elements of cortical excitatory synapses and are fundamental structures in memory, learning and cognition [19], these alterations constitute what we think is an important event in the pathogenesis of AD. Therefore, the presence of hyperphosphorylated-tau protein in neurons does not necessarily mean that they suffer severe and irreversible effects as thought previously, but rather the characteristic cognitive impairment in AD is likely to depend on the relative number of neurons that have well-developed NFTs.

Finally, interindividual variability also emerges in the control group (synaptic density ranged from 0.41 to $0.75 \text{ synapses}/\mu\text{m}^3$; see Additional file 1: Table S2). Although there are no studies in this brain region, previous studies on synaptic density in the temporal human cortex have shown variability depending on the gender (from 0.72 to $1.06 \text{ synapses}/\mu\text{m}^3$) [1]. Furthermore, it has been found that some cortical areas of the macaque monkey display synaptic differences linked to aging [52]. Thus, although the number of cases analyzed in the present study is relatively low, the interindividual variability found in the present study might also be explained by gender or age differences.

Analysis of the synaptic morphology

Synapses of layer II from TEC in AD patients showed similar morphological features to control cases. In particular, our results did not find any differences in the SAS area, perimeter and curvature. These results are also in line with some previous studies showing no changes in synaptic apposition length in AD patients [62, 68]. However, other studies performed in human tissue samples or animal models have shown an increase in synaptic apposition length, and these changes have been suggested to occur as a compensatory mechanism in response to the decrease in the number of synapses [2, 59, 60, 63, 69]. In this regard, it is important to point out

that in the present study, we have measured the SAS instead of the synaptic apposition length because of its advantages over other methods. First, it is extracted automatically from the previously segmented synaptic junction with no user intervention, avoiding any manual tracing and possible associated user bias [2, 50]. Second, the SAS, despite being a surface, is also a 3D object that adapts to, and reproduces the shape and curvature of the PSD. Third, quantitative information on the surface area, perimeter and curvature can also be extracted from the SAS, so size and shape can easily be correlated. Thus, the present results obtained from a large number of synaptic junctions segmented in 3D ($n = 4646$ synapses) provide support for there being no change in the SAS parameters evaluated here.

It is well established that synapses are dynamic structures than can undergo modifications due to variations in the activity patterns, and they are continuously remodeled and replaced [54]. Thus, our ultrastructural analysis indicates that this synaptic dynamism may not be altered in AD. Furthermore, the shape and size of the synaptic junctions are strongly correlated with release probability, synaptic strength, efficacy and plasticity [7, 27, 33, 51, 77, 83, 84]. However, we cannot rule out changes in the composition of neurotransmitter receptors, ion-channels, structural and signaling proteins, etc. For example, comparative human post-synaptic density (PSD) proteome analysis between control and AD patients has shown changes in several proteins involved in various cellular functions [17, 88]. Moreover, some loss of dendritic spines may occur in layer II of the TEC in AD or some dendritic spines may turn into non-synaptic dendritic spines [41, 47]. Thus, although no changes in the number of synapses were found in the present study, it is possible that a reorganization of synaptic targets (i.e., changes in the proportion of axo-spinous versus axo-dendritic shafts synapses) may occur in AD.

Synaptic distribution: 3D spatial analysis

The spatial distribution of synapses can be distributed according to 3 patterns: random pattern (where each synapse is equally likely to occur at any position); regular pattern (where each synapse is located as far as possible from its neighbors); and clustered pattern (where synapses tend to concentrate in groups). Moreover, when modeling the spatial distribution of synapses, we should take into account the fact that synaptic junctions cannot overlap because they are independent objects, and thus the minimum intersynaptic distances must be limited by the size of the synaptic junctions themselves [46].

Spatial distribution analysis showed that in both control and AD groups, synapses in the neuropil follow a random spatial distribution. Previous studies on the spatial distribution of synapses in plaque-free regions of

neuropil from the frontal cortex in AD patients, in the molecular layer of DG from APP/PS1 mice, and in control somatosensory cortex of rat have also found a random pattern distribution [2, 8, 46]. Thus, it seems that random distribution of synapses is a widespread rule of the cerebral cortex that does not appear to be affected in AD.

In addition to the analysis of the spatial distribution of synapses, we examined the distance of each synapse to its nearest synapse and we did not find significant differences between control subjects and AD patients. The lowest mean distance to the nearest synapse (678.91 nm) corresponds to the subject with the highest synaptic density, while the highest mean distance to the nearest synapse (1102.29 nm) belongs to the AD patient showing the lowest synaptic density. Thus, despite synaptic variability found between subjects, it seems that lower synaptic densities are related to higher distances. Since we found a significant reduction in TEC cortical thickness and not significant differences in the synaptic density, we would expect a reduction in the distance to the nearest synapse in AD patients. However, this distance was slightly higher (but not significant) supporting the notion of a reduction in the overall number of synapses in layer II of TEC in these patients.

Conclusions

In summary, the present results provide support for neuronal and synaptic loss also occurring in the TEC, in line with previous studies. However, this decrease is not due to a reduction in the synaptic density, but it is inferred from the reduction in TEC cortical thickness. Since it is likely that there is shrinkage of the dendritic arborization of neurons concomitant with the reduced cortical thickness, there must be a compensatory mechanism (for example, generation of new dendritic branches) in the surviving or healthy neurons in order to explain the lack of changes in synaptic density. Finally, whether or not synaptic loss precedes neuronal loss by synaptic disconnection is not known, but our previous studies on the morphological alterations in dendritic spines of pyramidal cells in AD patients [47] seem to provide strong support for synaptic loss preceding neuronal loss.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Estimation of the volume occupied by cells, blood vessels and neuropil using the method of Cavalieri. **Figure S2.** Serial images obtained by FIB/SEM from the neuropil of layer II of TEC from an Alzheimer's disease patient. **Figure S3.** Frequency plots of synaptic apposition surface (SAS) distribution. **Figure S4.** Analysis of the 3D synaptic spatial distribution. **Table S1.** Light microscopy data on volume fraction occupied by cortical elements in layer II of the TEC. **Table S2.** Data from the ultrastructural analysis of neuropil from layer II of the TEC. **Table S3.** Data regarding area (nm²), perimeter (nm) and curvature (ratio) of the SAS by individual cases. (PDF 1216 kb)

Abbreviations

3D: Three-dimensional; AD: Alzheimer's disease; APP/PS1: Amyloid precursor protein/presenilin-1 mouse model of Alzheimer's disease; AS: Asymmetric synapses; A β : Amyloid- β ; CA1: *Cornu ammonis* 1; CSR: Complete Spatial Randomness; DG: Dentate gyrus; EC: Entorhinal cortex; FIB/SEM: Focused ion beam/scanning electron microscopy; KS: Kolmogorov-Smirnov; MTL: Medial temporal lobe; MW: Mann-Whitney; NFTs: Neurofibrillary tangles; PB: Phosphate buffer; PRC: Perirhinal cortex; PSD: Post-synaptic density; SAS: Synaptic apposition surface; SD: Standard deviation; sem: Standard error of the mean; SS: Symmetric synapses; TEC: Transentorhinal cortex; V_v: Volume fraction

Acknowledgments

We would like to thank Carmen Álvarez, Miriam Marín and Lorena Valdés for their helpful assistance, and Nick Guthrie for his excellent text editing.

Funding

This study was funded by grants from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF 2015–66603-P), *Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas* (CIBERNED, Spain, CB06/05/0066), the Alzheimer's Association (ZEN-15-321663), and the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 720270 (Human Brain Project). MM-C was awarded a research fellowship from the Spanish Ministry of Education, Culture and Sport (grant FPU 14/02245).

Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

JDeF and LA-N oversaw and design the project. MD-A and LA-N designed and performed experiments. MD-A performed data analysis. LB-L and MM-C performed experiments and helped interpret experiments. RI provided some clinical specimens and helped interpret experiments. MD-A and LA-N drafted the initial manuscript. All authors read, reviewed, helped to edit, and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Brain tissue samples were obtained following the guidelines and approval of the Institutional Ethical Committee from all involved institutions: Bellvitge University Hospital (Barcelona, Spain); *Centro Alzheimer Fundación Reina Sofía*, CIEN Foundation (Madrid, Spain); and School of Medicine, University of Castilla-La Mancha, (Albacete, Spain).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón, 28223 Madrid, Spain. ²Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avda Doctor Arce, 37, 28002 Madrid, Spain. ³Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), ISCIII, Madrid, Spain. ⁴Laboratorio de Neuroanatomía Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Castilla-La Mancha, Almansa 14, 02006 Albacete, Spain. ⁵Depto. Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), c/Juan del Rosal, 10, 28040 Madrid, Spain.

Received: 15 February 2018 Accepted: 17 February 2018

Published online: 02 March 2018

References

- Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Rodríguez JR, DeFelipe J (2008) Gender differences in human cortical synaptic density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14615–14619

- Alonso-Nanclares L, Merino-Serrais P, González S, DeFelipe J (2013) Synaptic changes in the dentate gyrus of APP/PS1 transgenic mice revealed by electron microscopy. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:386–395
- Alzheimer's Association (2017) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 13:325–373
- Anton-Sanchez L, Bielza C, Merchán-Pérez A, Rodríguez JR, DeFelipe J, Larrañaga P (2014) Three-dimensional distribution of cortical synapses: a replicated point pattern-based analysis. *Front Neuroanat* 8:85
- Arendt T (2009) Synaptic degeneration in AD. [review]. *Acta Neuropathol* 118:167–179
- Baddeley A (2010) Analysing spatial point patterns in R. Clayton south. CSIRO, Canberra
- Biederer T, Kaeser PS, Blanpied TA (2017) Transcellular Nanoalignment of synaptic function. *Neuron* 96:680–696
- Blazquez-Llorca L, Merchán-Pérez Á, Rodríguez JR, Gascón J, DeFelipe J (2013) FIB/SEM technology and AD: three-dimensional analysis of human cortical synapses. *J Alzheimers Dis* 34:995–1013
- Blazquez-Llorca L, Woodruff A, Inan M, Anderson SA, Yuste R, DeFelipe J et al (2015) Spatial distribution of neurons innervated by chandelier cells. *Brain Struct Funct* 220:2817–2834
- Braak H, Braak E (1985) On areas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocortex in the human brain. Normal morphology and lamina-specific pathology in AD. *Acta Neuropathol* 68:325–332
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259
- Braak H, Del Tredici K (2012) Where, when, and in what form does sporadic Alzheimer's disease begin? *Curr Opin Neurol* 25:708–714
- Braak H, Del Tredici K (2015) The preclinical phase of the pathological process underlying sporadic AD. [review]. *Brain* 138:2814–2833
- Braak H, Braak E, Yilmazer D, Bohl J, Braak H, Braak E (1996) Topical review: functional anatomy of human hippocampal formation and related structures. [review]. *J Child Neurol* 11:265–275
- Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K (2011) Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol* 70(11):960–969
- Castellani RJ, Nunomura A, Lee HG, Perry G, Smith MA (2008) Phosphorylated tau: toxic, protective, or none of the above. *J Alzheimers Dis* 14:377–383
- Chang RYK, Nouwens AS, Dodd PR, Etheridge N (2013) The synaptic proteome in AD. *Alzheimer's Dement* 9:499–511
- Coleman P, Federoff H, Kurlan R (2004) A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. [review]. *Neurology* 63:1155–1162
- DeFelipe J (2015) The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. [review]. *Front Neuroanat* 9:14
- DeFelipe J, Fairén A (1993) A simple and reliable method for correlative light and electron microscopic studies. *J Histochem Cytochem* 41:769–772
- DeFelipe J, Fariñas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic input. [review]. *Prog Neurobiol* 39:563–607
- DeFelipe J, Marco P, Busturia I, Merchán-Pérez A (1999) Estimation of the number of synapses in the cerebral cortex: methodological considerations. [review]. *Cereb Cortex* 9:722–732
- Dickson DW, Crystal HA, Bevana C, Honer W, Vincent I, Davies P (1995) Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol Aging* 16:285–304
- Ding SL, Van Hoesen GW (2010) Borders, extent, and topography of human Perirhinal cortex as revealed using multiple modern neuroanatomical and pathological markers. *Hum Brain Map* 31:1359–1379
- Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J (2015) Analyzing dendritic spine pathology in AD: problems and opportunities. [review]. *Acta Neuropathol* 130:1–19
- Ferrer I (2012) Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. [review]. *Prog Neurobiol* 97:38–51
- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geinisman Y (2004) Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. *J Comp Neurol* 468:86–95
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT (1996) Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild AD. *J Neurosci* 16:4491–4500

29. Gray EG (1959) Axi-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 4:420–433
30. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Miziller A, Nielsen K et al (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. [review]. *APMIS* 96:379–394
31. Gyllys KH, Fein JA, Yang F, Wiley DJ, Miller CA, Cole GM (2004) Synaptic changes in AD: increased amyloid-beta and gliosis in surviving terminals is accompanied by decreased PSD-95 fluorescence. *Am J Pathol* 165:1809–1817
32. Henstridge CM, Pickett E, Spires-Jones TL (2016) Synaptic pathology: a shared mechanism in neurological disease. [review]. *Ageing Res Rev* 28:72–84
33. Holderith N, Lorincz A, Katona G, Rózsa B, Kulik A, Watanabe M, Nusser Z (2012) Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat Neurosci* 15:988–997
34. Honer WG, Dickson DW, Gleeson J, Davies P (1992) Regional synaptic pathology in AD. *Neurobiol Aging* 13:375–382
35. Insausti R, Amaral DG (2008) Entorhinal cortex of the monkey: IV. Topographical and laminar organization of cortical afferents. *J Comp Neurol* 509:608–641
36. Insausti R, Muñoz-López M, Insausti AM, Artacho-Pérua E (2017) The human Periallocortex: layer pattern in Presubiculum, Parasubiculum and entorhinal cortex. [review]. *Front Neuroanat* 11:84
37. Insausti R, Salinas A, Sanz E, Insausti A, Sobreviola T, Gonzalo LM (1994) The human perirhinal cortex. Architecture in controls and in Alzheimer's disease. Proceedings of the 24th annual meeting of the Society for Neuroscience November, Miami, USA
38. King DL, Arendash GW (2002) Maintained synaptophysin immunoreactivity in Tg2576 transgenic mice during aging: correlations with cognitive impairment. *Brain Res* 926:58–68
39. Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M et al (2007) Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 27:796–807
40. Llorens-Martín M, Fuster-Matanzo A, Teixeira CM, Jurado-Arjona J, Ulloa F, DeFelipe J et al (2013) GSK-3 β overexpression causes reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo. *Mol Psychiatry* 18:451–460
41. Llorens-Martín M, Blazquez-Llorca L, Benavides-Piccione R, Rábano A, Hernandez F, Avila J et al (2014) Selective alterations of neurons and circuits related to early memory loss in AD. [review]. *Front Neuroanat* 8:38
42. Mai J, Majtanik M, Paxinos G (2016) Atlas of the human brain, 4th edn. Academic Press/Elsevier, San Diego
43. Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW et al (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of AD. *Neurology* 56:127–129
44. Masliah E, Terry RD, Alford M, Deterosa R (1990) Quantitative immunohistochemistry of Synaptophysin in human neocortex: an alternative method to estimate density of presynaptic terminals in paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 38:837–844
45. Merchán-Pérez A, Rodríguez JR, Alonso-Nanclares L, Schertel A, DeFelipe J (2009) Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Front Neuroanat* 3:18
46. Merchán-Pérez A, Rodríguez JR, González S, Robles V, DeFelipe J, Larrañaga P et al (2014) Three-dimensional spatial distribution of synapses in the neocortex: a dual-beam electron microscopy study. *Cereb Cortex* 24:1579–1588
47. Merino-Serrais P, Benavides-Piccione R, Blazquez-Llorca L, Kastanauskaitė A, Rábano A, Avila J et al (2013) The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with AD. *Brain* 136:1913–1928
48. Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM et al (1991) The consortium to establish a registry for AD(CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of AD. *Neurology* 41:479–486
49. Morales J, Alonso-Nanclares L, Rodríguez JR, DeFelipe J, Rodríguez Á, Merchán-Pérez Á (2011) Espina: a tool for the automated segmentation and counting of synapses in large stacks of electron microscopy images. *Front Neuroanat* 18:18
50. Morales J, Rodríguez A, Rodríguez JR, DeFelipe J, Merchán-Pérez A (2013) Characterization and extraction of the synaptic apposition surface for synaptic geometric analysis. *Front Neuroanat* 7:20
51. Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21:545–559
52. Peters A, Kemper T (2012) A review of the structural alterations in the cerebral hemispheres of the aging rhesus monkey. [review]. *Neurobiol Aging* 33:2357–2372
53. Peters A, Palay SL (1996) The morphology of synapses. [review]. *J Neurocytol* 25:687–700
54. Peters A, Palay SL, Webster HD (1991) The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. Oxford University Press, New York, p 528
55. Pozueta J, Lefort R, Shelanski ML (2013) Synaptic changes in AD and its models. [review]. *Neurosci* 251:51–65
56. Prieto C, Eimil M, López de Silanes C, Llanero M (2011) Impacto social de la enfermedad de alzheimer y otras demencias. In: Fundación Española de Enfermedades Neurológicas
57. Rajmohan R, Reddy PH (2017) Amyloid-Beta and Phosphorylated tau accumulations cause abnormalities at synapses of AD neurons. [review]. *J Alzheimers Dis* 57:975–999
58. Raskin J, Cummings J, Hardy J, Schuh K, Dean RA (2015) Neurobiology of AD: integrated molecular, physiological, anatomical, biomarker, and cognitive dimensions. [review]. *Curr Alzheimer Res* 12:712–722
59. Scheff SW, Price DA (1993) Synapse loss in the temporal lobe in AD. *Ann Neurol* 33:190–199
60. Scheff SW, Price DA (1998) Synaptic density in the inner molecular layer of the hippocampal dentate gyrus in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:1146–1153
61. Scheff SW, Price DA (2003) Synaptic pathology in AD: a review of ultrastructural studies. [review]. *Neurobiol Aging* 24:1029–1046
62. Scheff SW, Price DA (2006) AD-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus. [review]. *J Alzheimers Dis* 9:101–115
63. Scheff SW, Dekosky ST, Price DA (1990) Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 11:29–37
64. Scheff SW, Price DA, Ansari MA, Roberts KN, Schmitt FA, Ikonomovic MD et al (2015) Synaptic change in the posterior cingulate gyrus in the progression of AD. *Alzheimers Dis* 43:1073–1090
65. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Dekosky ST, Mufson EJ (2007) Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68:1501–1508
66. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ (2006) Hippocampal synaptic loss in early AD and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 27:1372–1384
67. Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Scheff MA, Mufson EJ (2011) Synaptic loss in the inferior temporal gyrus in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *J Alzheimers Dis* 24:547–557
68. Scheff SW, Sparks DL, Price DA (1993) Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in AD. *Ann Neurol* 34:356–361
69. Scheff SW, Sparks DL, Price DA (1996) Quantitative assessment of synaptic density in the outer molecular layer of the hippocampal dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Dementia* 7:226–232
70. Selkoe DJ (2002) AD is a synaptic failure. *Science* 298:789–791
71. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. [review]. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1:a006189
72. Šimić G, Leko MB, Wray S, Harrington CR, Delalle I, Jovanov-Milošević N et al (2017) Monoaminergic neuropathology in Alzheimer's disease. [review]. *Prog Neurobiol* 151:101–138
73. Spires-Jones TL, Hyman B (2014) The intersection of amyloid Beta and tau at synapses in AD. [review]. *Neuron* 82:756–771
74. Stern Y (2002) What is cognitive reserve? Theory and research application of the reserve concept. [review]. *JINS* 8:448–460
75. Stern Y (2006) Cognitive reserve and Alzheimer disease. [review]. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 20:112–117
76. Stern Y (2009) Cognitive Reserve. *Neuropsychologia* 47:2015–2028
77. Südhof TC (2012) The presynaptic active zone. *Neuron* 75:11–25
78. Suzuki WA (1996) The anatomy, physiology and functions of the perirhinal cortex. [review]. *Curr Opin Neurobiol* 6:179–188

79. Suzuki WA, Amaral DG (1994) Topographic organization of the reciprocal connections between the monkey entorhinal cortex and the perirhinal and parahippocampal cortices. *J Neurosci* 14:1856–1877
80. Suzuki WA, Amaral DG (1994a) Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cortical afferents. *J Comp Neurol* 350:497–533
81. Suzuki WA, Naya Y (2014) The Perirhinal cortex. [review]. *Annu Rev Neurosci* 37:39–53
82. Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ (1997) Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:933–944
83. Takumi Y, Ramirez-Leon V, Laake P, Rinvik E, Ottersen OP (1999) Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci* 2:618–624
84. Tarusawa E, Matsui K, Budisantoso T, Molnar E, Watanabe M, Matsui M, Fukazawa Y, Shigemoto R (2009) Input-specific intrasynaptic arrangements of ionotropic glutamate receptors and their impact on postsynaptic responses. *J Neurosci* 29:12896–12908
85. Taylor KI, Probst A (2008) Anatomic localization of the transentorhinal region of the perirhinal cortex. *Neurobiol Aging* 29:1591–1596
86. Van Hoesen GW, Hyman BT, Damasio AR (1991) Entorhinal cortex pathology in AD. *Hippocampus* 1:1–8
87. Wilcox KC, Lacor PN, Pitt J, Klein WL (2011) A β oligomer-induced synapse degeneration in AD. *Cell Mol Neurobiol* 31:939–948
88. Zhou J, Jones DR, Duong DM, Levey AI, Lah JJ, Peng J (2013) Proteomic analysis of postsynaptic density in Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 420:62–68
89. Zhou L, McInnes J, Wierda K, Holt M, Herrmann AG, Jackson RJ et al (2017) Tau association with synaptic vesicles causes presynaptic dysfunction. *Nat Commun* 8:15295

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Disorders of the Nervous System

3D Electron Microscopy Study of Synaptic Organization of the Normal Human Transentorhinal Cortex and Its Possible Alterations in Alzheimer's Disease

M. Domínguez-Álvarez,¹ M. Montero-Crespo,^{1,2} L. Blazquez-Llorca,^{1,3}  J. DeFelipe,^{1,2,4} and  L. Alonso-Nanclares^{1,2,4}

<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0140-19.2019>

¹Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales, Centro de Tecnología Biomédica, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid 28223, Spain, ²Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid 28002, Spain, ³Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Madrid 28040, Spain, and ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid 28031, Spain

Abstract

The transentorhinal cortex (TEC) is an obliquely oriented cortex located in the medial temporal lobe and, together with the entorhinal cortex, is one of the first affected areas in Alzheimer's disease (AD). One of the most widely accepted hypotheses is that synaptopathy (synaptic alterations and loss) represents the major structural correlate of the cognitive decline observed in AD. However, very few electron microscope (EM) studies are available; the most common method to estimate synaptic density indirectly is by counting, at the light microscopic level, immunoreactive puncta using synaptic markers. To investigate synaptic morphology and possible alterations related to AD, a detailed three-dimensional (3D) ultrastructural analysis using focused ion beam/scanning EM (FIB/SEM) was performed in the neuropil of Layer II of the TEC in human brain samples from non-demented subjects and AD patients. Evaluation of the proportion and shape of asymmetric synapses (AS) and symmetric synapses (SS) targeting spines or dendritic shafts was performed using 3D reconstructions of every synapse. The 3D analysis of 4722 synapses revealed that the preferable targets were spine heads for AS and dendritic shafts for SS, both in control and AD cases. However, in AD patients, we observed a reduction in the percentage of synapses targeting spine heads. Regarding the shape of synapses, in both control cases and AD samples, the vast majority of synapses had a macular shape, followed by perforated or horseshoe-shaped synapses, with fragmented synapses being the least frequent type. Moreover, comparisons showed an increased number of fragmented AS in AD patients.

Key words: dementia; dendritic shafts; dendritic spines; FIB/SEM; synaptic morphology

Significance Statement

Determination of postsynaptic targets, shape and size of the synaptic junctions provide critical data on synaptic functionality. However, as far as we know, detailed three-dimensional (3D) synaptic morphology and identification of postsynaptic targets in serial sections have not been performed before in the human brain. The present study represents the first attempt to unveil the synaptic organization of the neuropil of the human brain at the ultrastructural level using 3D electron microscopy (EM). Our present results provide a new, large, quantitative ultrastructure dataset of the synaptic organization of the normal human cortex and of the synaptic alterations that occur in Alzheimer's disease (AD). Thus, these results may help to understand the relationship between alterations of the synaptic circuits and the cognitive deterioration in AD.

Introduction

The transentorhinal cortex (TEC) is an obliquely oriented cortex located in the medial temporal lobe between the perirhinal cortex and the entorhinal cortex and is considered as a transitional zone between the periallocortex and the proisocortex (Braak and Braak, 1985; Braak et al., 1996; Insausti et al., 2017). This cortical region, together with the entorhinal cortex, is one of the first affected regions in Alzheimer's disease (AD). AD is characterized by two hallmark lesions: extracellular amyloid- β (A β)-plaques and intracellular neurofibrillary tangles of filamentous aggregates of hyperphosphorylated tau protein (Alzheimer's Association, 2018). In particular, neurofibrillary tangles first affect the TEC (Braak and Braak, 1991).

A β peptides and tau proteins play normal roles at the synapse, but under pathologic conditions, they may lead to toxic effects at both presynaptic and postsynaptic elements, leading to synaptic loss and causing dysfunction in neurotransmitter release (Spires-Jones and Hyman, 2014; Dorostkar et al., 2015; Henstridge et al., 2016; Rajmohan and Reddy, 2017; Zhou et al., 2017). At present, one of the most widely accepted hypothesis is that synaptopathy (synaptic alterations and loss) represents the major structural correlate of the cognitive decline observed in AD (Dickson et al., 1995; Sze et al., 1997; Masliah et al., 2001; Selkoe, 2002; Coleman et al., 2004; Arendt, 2009).

In a previous study, Domínguez-Álvaro et al. (2018) focused ion beam/scanning electron microscopy (FIB/SEM) was used to study the possible alterations of synapses in the neuropil of Layer II of TEC in human brain samples from AD patients. Unexpectedly, it was observed that there were no significant differences in the density, size and spatial distribution of synapses between AD and control samples. However, cortical thickness of the TEC in AD patients was reduced (35% thinner than in control subjects). Thus, a decrease in the total number of synapses in AD occurs in Layer II of the TEC. It was proposed

that the surviving TEC neurons might display a compensatory mechanism (such as the generation of new dendritic branches), which would explain the lack of changes in the synaptic density.

It is well established that synapses are continuously formed, eliminated and/or reshaped in response to synaptic activity (Fauth and Tetzlaff, 2016). Synapses are dynamic elements that can change in terms of not only their function, but also their morphology and molecular features (Wegner et al., 2018). These synaptic morphological changes may include an increase in the number of perforated synapses [with one or more holes in the postsynaptic density (PSD)] or fragmented synapses (with several PSDs; Geinisman et al., 1987, 1991, 1992a,b). How these morphological changes affect the synaptic function is unknown, but since larger PSDs contain more receptors, it may be that these changes are related to changes in the synaptic transmission efficiency, as proposed for long-term potentiation (LTP; Lüscher et al., 2000).

Changes in the postsynaptic elements have also been described in AD patients and in animal models of AD, specifically, morphological alterations of dendritic spines (for simplicity, spines; Spires-Jones et al., 2007; Knafo et al., 2009; Tackenberg et al., 2009; Merino-Serrais et al., 2011, 2013; Pozueta et al., 2013), which are the major targets of excitatory synapses in the cerebral cortex (for review, see DeFelipe, 2015). Whether or not synaptic loss precedes neuronal loss by synaptic disconnection is not known, but previous studies on the morphological alterations in spines of pyramidal cells in AD patients (Merino-Serrais et al., 2013) appear to support the notion of synaptic loss preceding neuronal loss.

Finally, as far as we know, detailed three-dimensional (3D) synaptic morphology and identification of postsynaptic targets in serial sections have not been performed before in the human brain in either control cases or in AD patients. Thus, in the present study, FIB/SEM was used to determine the proportion and shape of asymmetric synapses (AS) and symmetric synapses (SS) targeting spines or dendritic shafts of 4722 synapses that were 3D reconstructed from the neuropil of Layer II of the TEC, from AD patients and control (non-demented) subjects. Accordingly, the present study represents the first attempt to unveil the synaptic organization of the neuropil of the human brain in both control and AD. This study provides a new, large, quantitative ultrastructure dataset of the synaptic organization of the normal human cortex and of the possible synaptic alterations that occur in AD.

Materials and Methods

Tissue preparation

Human brain tissue was obtained at autopsy from three sources: Pathologic Anatomy Service of Bellvitge University Hospital (Barcelona, Spain); Centro Alzheimer Fundación Reina Sofía, CIEN Foundation (Madrid, Spain); and from the Unidad Asociada Neuromax, Laboratorio de Neuroanatomía Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete and the Laboratorio

Received April 11, 2019; accepted May 27, 2019; First published June 19, 2019.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: M.D.-A., M.M.-C., L.B.-L., and L.A.-N. performed research; M.D.-A. analyzed data; M.D.-A. and L.A.-N. wrote the paper; J.D. and L.A.-N. designed research.

This work was funded by grants from the "Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades" (grant PGC2018-094307-B-I00), Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, Spain, CB06/05/0066), the Alzheimer's Association (ZEN-15-321663), and the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under grant agreement No. 785907 (Human Brain Project, second specific grant agreement [SGA2]). M.M.-C. was awarded an FPU contract (14/02245) from the Spanish "Ministerio de Educación, Cultura y Deporte" (MECD).

Acknowledgements: We thank Carmen Álvarez, Miriam Marín, and Lorena Valdés for their technical assistance; Dr. Bojan Mihaljevic for statistical assessment; Dr. Andrea Santuy for her patience; and Nick Guthrie for his excellent text editing.

Correspondence should be addressed to L. Alonso-Nanclares at aidil@cajal.csic.es.

<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0140-19.2019>

Copyright © 2019 Domínguez-Álvaro et al.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Table 1. Clinical and neuropathological information

Patient	Gender	Age (years)	Cause of death	Postmortem delay (h)	Braak stage	CERAD stage	Neuropsychological diagnosis
AB1	Male	45	Lung cancer	<1	NA	NA	NA
AB2	Female	53	Pulmonary shock	4	NA	NA	NA
IF10	Male	66	Bronchopneumonia plus cardiac failure	2	NA	NA	NA
M16	Male	40	Traffic accident	3	NA	NA	NA
M17	Male	36	Bronchopneumonia	2.5	NA	NA	NA
IF1	Female	80	–	2	IV	B	No evidence of cognitive impairment and dementia
IF2	Female	94	Pulmonary tuberculosis	1.5	V	C	Dementia
IF6	Male	85	Pneumonia	2	III	A	Mild cognitive impairment
VK11	Female	87	Respiratory inflammation	1.5	III–IV	A	Dementia
VK22	Female	86	–	2	V	C	Dementia

Braak Stages (Braak and Braak, 1991): III (NFTs in entorhinal cortex and closely related areas); III-IV (NFTs abundant in amygdala and hippocampus. Extending slightly into association cortex); V-VI (NFTs widely distributed throughout the neocortex and ultimately involving primary motor and sensory areas). CERAD Stages (Mirra et al., 1991): A (Low density of neuritic plaques); B (Intermediate density of neuritic plaques); C (High density of neuritic plaques). NA: Not applicable; NFTs: neurofibrillary tangles. – : Not available.

Cajal de Circuitos Corticales UPM-CSIC (Madrid, Spain). The tissue was obtained following national laws and international ethical and technical guidelines on the use of human samples for biomedical research purposes. Briefly, tissue samples were obtained from five control cases (with no recorded neurological or psychiatric alterations) and five AD patients according to the neuropathological criteria provided by the above-mentioned centers. As outlined in a previous study, immunostaining for anti-PHF-Tau and anti-A β in the same control cases revealed no presence of A β -plaques and only occasional PHF-Tau neurons. By contrast, in AD patients, the same immunostaining revealed the presence of a variable number of immunoreactive PHF-Tau neurons and A β -plaques (Domínguez-Álvarez et al., 2018, their Table 1).

In all cases, the time between death and tissue processing was lower than 4 h (Table 1). On removal, brain tissue was fixed in cold 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB; Panreac, 131965), pH 7.4, for 24–48 h. After fixation, the tissue was washed in PB and coronally sectioned in a vibratome (150- μ m thickness; Vibratome Sectioning System, VT1200S Vibratome, Leica Biosystems). Sections containing TEC were selected and processed for EM as described elsewhere (Domínguez-Álvarez et al., 2018). Briefly, fixed sections were treated with 1% OsO₄ (Sigma, O5500), 0.1% potassium ferrocyanide (Probus, 23345) and 0.003% CaCl₂ in sodium cacodylate buffer (0.1 M) for 1 h at room temperature. After washing in PB, sections were stained with 2% uranyl acetate (EMS, 8473), and then dehydrated and flat-embedded in Araldite (TAAB, E021; DeFelipe and Fairén, 1993). Embedded sections were glued onto a blank Araldite block and trimmed. Semithin sections (1–2 μ m thick) were obtained from the surface of the block and stained with 1% toluidine blue (Merck, 115930) in 1% sodium borate (Panreac, 141644). The last semithin section (which corresponds to the section immediately adjacent to the block surface) was examined under light microscope and photographed to accurately locate the neuropil regions to be examined. Tissue shrinkage due to EM processing was estimated by measuring the area

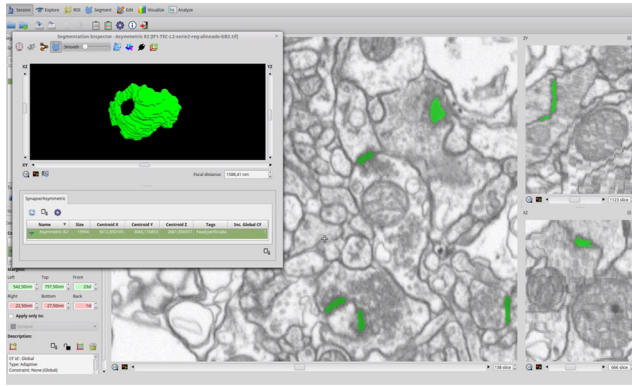
before and after processing to correct the final values in both control and AD cases (Merchán-Pérez et al., 2009). The area after processing was divided by the area value measured before processing to obtain a shrinkage factor for any area measurement (p^2) of 0.933.

3D EM

3D samples of Layer II from the TEC were obtained from all cases using a dual beam microscope (Crossbeam Neon40 EsB, Carl Zeiss NTS GmbH). This instrument combines a high-resolution field-emission SEM column with a focused gallium ion beam (FIB), which permits removal of thin layers of material from the sample surface on a nanometer scale. As soon as one layer of material is removed by the FIB (20 nm thick), the exposed surface of the sample is imaged by the SEM, using the backscattered electron detector. The sequential automated use of FIB milling and SEM imaging allowed us to obtain long series of photographs of a 3D sample of selected regions (Merchán-Pérez et al., 2009). Image resolution in the xy plane was 5 nm/pixel. Resolution in the z-axis (section thickness) was 20 nm, and image size was 2048 \times 1536 pixels. The number of sections per stack ranged from 149 to 472, which corresponds to a corrected volume ranging from 260.2 to 824.4 μ m³ (mean: 471.3 μ m³). A total of 30 stacks of images of the neuropil from Layer II of the TEC were obtained (three stacks per case, for all 10 cases; total volume studied: 14,140 μ m³). These images from the neuropil were obtained avoiding the neuronal and glial somata, blood vessels and, in the case of AD cases, also avoiding A β -plaques (plaque-free regions) to avoid the effect of alterations of synapses in the vicinity of A β -plaques, which has been described previously (Blazquez-Llorca et al., 2013).

Synaptic 3D analysis

Stacks of images obtained by the FIB/SEM were analyzed using EspINA software (EspINA Interactive Neuron Analyzer, 2.1.9; <http://cajalbbp.cesvima.upm.es/espina/>); 3D reconstructed synapses were classified as AS (excitatory) or SS (inhibitory) based on their prominent or thin



Movie 1. Video of the EspINA software user interface. FIB/SEM sections are viewed through the xy-plane (as obtained by FIB/SEM microscopy) and yz- and xz-plane. 3D reconstruction of a perforated synapse is shown in the three orthogonal planes. This 3D reconstruction of one perforated synapse is shown in green at the end of the video. The 3D reconstruction of the synapse allows us to identify the morphology of the synapse as perforated. [View online]

PSD, respectively (Gray, 1959; Colonnier, 1968; Peters and Palay, 1996).

EspINA software calculated the size of every synapse and also extracted the synaptic apposition surface (SAS) area, which provides the morphological features of the synapse, as an indicative measurement of the synaptic functionality (Morales et al., 2013).

EspINA was also used to visualize each of the reconstructed synapses in 3D and to detect the possible presence of perforations or deep indentations in their perimeters (an additional movie file shows this in more detail; Movie 1). Regarding the shape of the PSD, the synaptic junctions could be classified into four main types, according to Santuy et al. (2018a): macular (disk-shaped PSD); perforated (with one or more holes in the PSD); horseshoe-shaped (perimeter with an indentation) and fragmented (irregular small disk-shaped PSDs with no connection between them; Fig. 1A).

To identify the postsynaptic targets of 3D reconstructed synapses, the image stack was navigated to determine whether the postsynaptic element was a dendritic spine or a dendritic shaft. A condition for unambiguous identi-

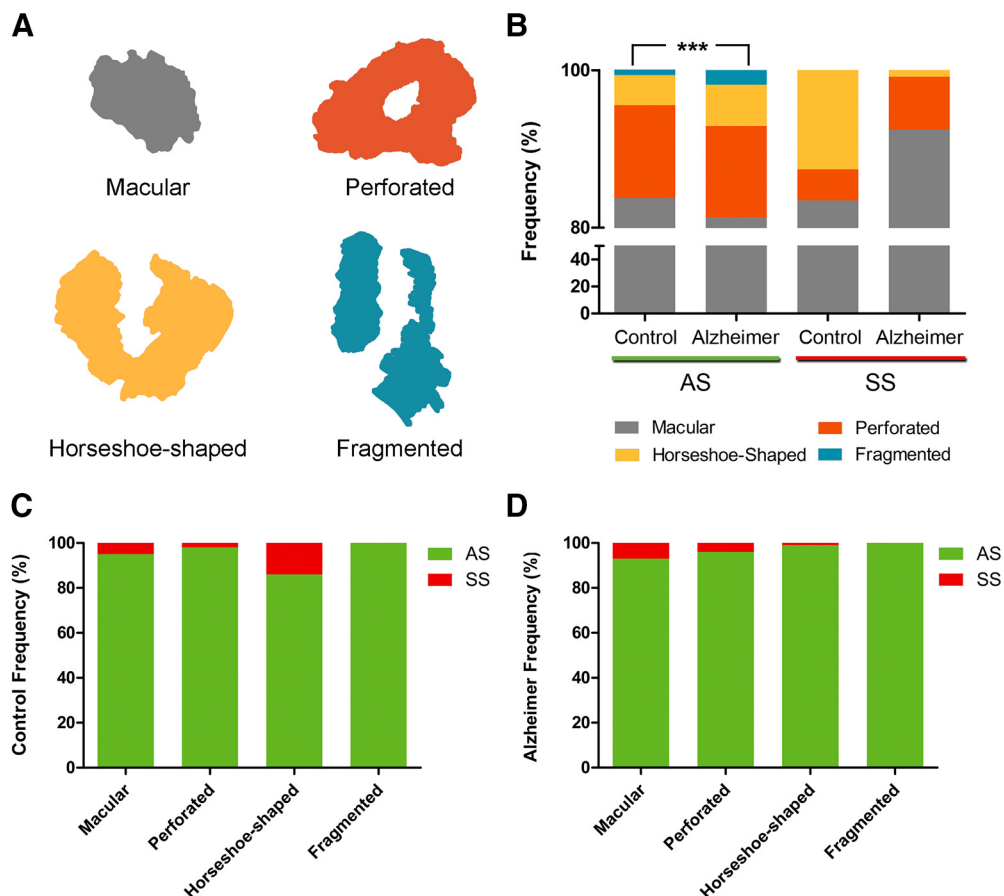


Figure 1. **A**, Schematic representation of the shape of the synaptic junctions: macular synapses with continuous disk-shaped PSD; perforated synapses with holes in the PSD; horseshoe-shaped with tortuous horseshoe-shaped perimeter with an indentation; and fragmented synapses with two PSDs with no connections between them. **B**, Proportion of macular, perforated, horseshoe-shaped, and segmented AS and SS in control cases and AD patients. In AD patients, fragmented synapses were significantly more frequent than in control cases (χ^2 , $p < 0.001$). **C**, Proportion of AS and SS belonging to each morphological category in control cases. The horseshoe-shaped synapses were significantly more frequent among SS than AS (χ^2 , $p < 0.0001$). **D**, Proportion of AS and SS belonging to each morphological category in AD cases. *** $p < 0.001$.

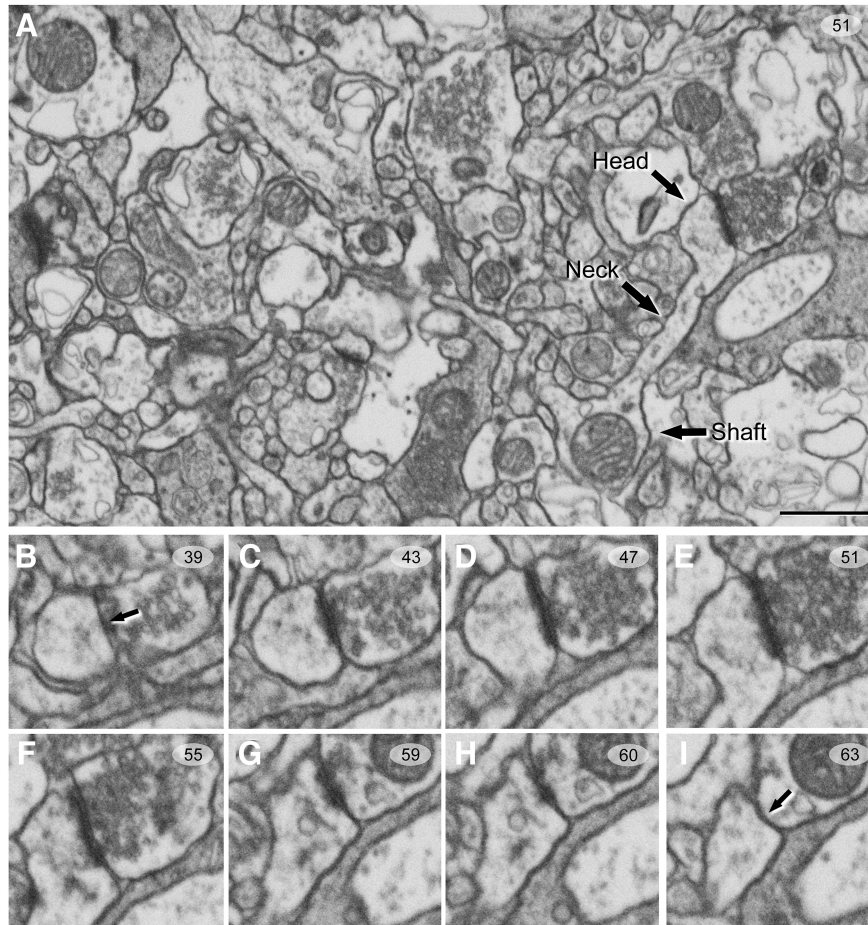


Figure 2. Serial images obtained by FIB/SEM from the human neuropil of Layer II of TEC. **A**, Low-magnification photograph showing a spine head, spine neck, and dendritic shaft in a single image. **B–I**, Selected sections (39–63) from an FIB/SEM stack of serial sections, to illustrate an AS targeting a spine head. Arrows (in **B**, **I**) indicate the beginning and the ending, respectively, of the synapse targeting a spine head. Scale bar, show in **A**, indicates 850 nm in **A** and 500 nm in **B–I**.

fication of spines, versus dendritic shafts, was that the dendritic spine could be visually traced to the parent dendrite (Fig. 2). Accordingly, when the postsynaptic element of a synapse was close to the margins and it was truncated by the borders of the stack, the identity of the postsynaptic target could not be determined. Truncated elements that could not be conclusively identified were labeled as “unknown.” Therefore, the targets of synapses were classified into two main categories: dendritic spines and dendritic shafts. When the postsynaptic target was a dendritic spine, we further recorded the position of the synapse on the head or neck. We also determined whether the target dendrite was a spiny dendrite or a non-spiny one (Santuy et al., 2018b).

In addition, EspINA allowed the application of an unbiased 3D counting frame (CF) to perform direct counting (for details, see Merchán-Pérez et al., 2009). This 3D unbiased CF is a regular rectangular prism enclosed by three acceptance planes and three exclusion planes marking its boundaries (Fig. 3). All objects within the CF are counted, as are those intersecting any of the acceptance planes, while objects that are outside the CF, or intersecting any of the exclusion planes, are not counted.

In this study, we have determined the morphology and postsynaptic target of 4722 synapses inside the 3D CF of the neuropil of Layer II of the TEC, from AD patients and control (with no recorded neurological or psychiatric alterations) subjects.

Statistical analysis

To perform statistical comparisons of AS and SS proportions, χ^2 test was used for contingency tables. The same method was used to study whether there were significant differences between groups in relation to the shape of the synaptic junctions and their postsynaptic target. Briefly, in all the χ^2 statistical analyses, we firstly performed an “omnibus test” based on 2×4 contingency tables. To further investigate the specific cells driving the significance of the χ^2 test, partitioning procedure was applied to create 2×2 contingency tables (Sharpe, 2015). To identify possible differences within a group regarding the synaptic size (SAS area, perimeter and ratio) related to the shape of the synapses and their postsynaptic target, a Kruskal–Wallis (KW) nonparametric test was performed (the normality and homoscedasticity criteria were not met). Differences in the synaptic size between groups were evaluated by using the unpaired Mann–

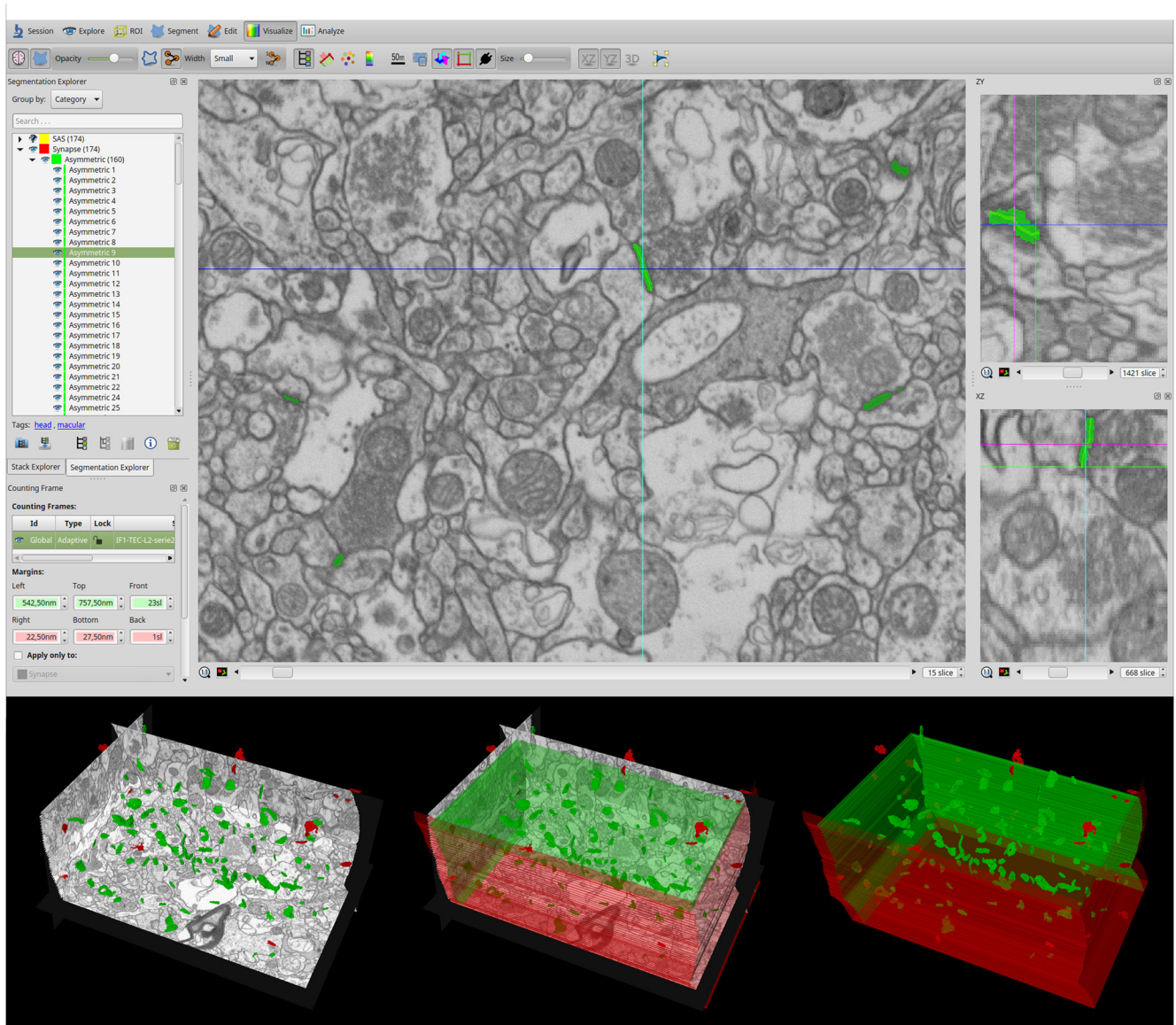


Figure 3. Screenshot of the EspINA software user interface. In the main window (top), the sections are viewed through the xy-plane (as obtained by FIB/SEM microscopy). The other two orthogonal planes, yz and xz, are also shown in adjacent windows (on the right). The 3D windows (bottom left) show the three orthogonal planes and the 3D reconstruction of segmented synapses. A 3D rectangular unbiased CF is shown on the bottom. The three acceptance planes are represented in green and three exclusion planes in red. Synapses inside the CF are colored in green and synapses outside the CF in red.

Whitney (MW) nonparametric U test. Frequency distribution analysis of the SAS was performed using Kolmogorov–Smirnov (KS) nonparametric test. Statistical studies were performed with the aid of the GraphPad Prism statistical package (Prism 5.00 for Windows, GraphPad Software Inc.) and SPSS program (IBM SPSS Statistics v24, IBM Corp.).

Results

Stacks of images obtained by the FIB/SEM were analyzed using EspINA software, which allows the segmentation of synapses in the reconstructed 3D volume (Morales et al., 2011). These TEC samples have been previously used to determine the density and size of synapses, as well as their spatial distribution (Dominguez-

Álvaro et al., 2018). Since the synaptic junctions were fully 3D reconstructed, as described elsewhere (Merchán-Pérez et al., 2009), each synapse could be classified as AS (excitatory) or SS (inhibitory), based on its prominent or thin PSD, respectively (Gray, 1959; Colonnier, 1968; Peters et al., 1991; Peters and Palay, 1996). In these stacks of images, it was also feasible to accurately determine the synaptic targets, which is critical from the point of view of the synaptic organization.

Distribution of postsynaptic targets

Postsynaptic targets were classified into two main categories: dendritic spines and dendritic shafts. In addition, when the postsynaptic target was a dendritic spine, we

Table 2. Distribution of AS and SS on spines and dendritic shafts in control cases and AD patients

Group	Type of synapse	Synapses on spine heads	Synapses on spine necks	Synapses on aspiny dendritic shaft	Synapses on spiny dendritic shaft	Total synapses
Control	AS	59.1% (825)	0.5% (7)	19.9% (278)	20.5% (286)	100% (1396)
	SS	7.1% (8)	0.9% (1)	38.4% (43)	53.6% (60)	100% (112)
Alzheimer	AS	50.2% (579)	0.7% (8)	28.0% (323)	21.1% (243)	100% (1153)
	SS	8.8% (9)	1.0% (1)	41.2% (42)	49.0% (50)	100% (102)

Synapses on spines have been sub-divided into those that are established on spine heads and those that are established on spine necks. Moreover, we differentiated between aspiny and spiny dendritic shafts. Data are expressed as percentages with the absolute number of synapses studied given in parentheses. Data for each individual case are represented in Table 2-1. Data expressed as absolute number of synapses were taken from this table to perform contingency tables showed in Table 2-2 and Table 2-3.

recorded the position of the synapse on the head or on the neck. When the postsynaptic target was a dendritic shaft, we also classified the dendrites as spiny or non-spiny, based on the presence or absence of spines, respectively.

Control

We determined the postsynaptic structures of 1396 AS whose target could be unambiguously identified as spines or dendritic shafts. Similarly, we analyzed a total of 112 SS.

In a previous study, it was found that AS outnumber SS ~95:5 (Domínguez-Álvaro et al., 2018). In the present study, we observed that 59.1% of AS were established on spine heads and 0.5% on spine necks. The remaining AS were established on dendritic shafts: 40.4% (19.9% on aspiny dendritic shafts and 20.5% on spiny shafts; Table 2; Extended Data Table 2-1). SS showed a clearly different preference for postsynaptic targets: 92% were established on dendritic shafts (53.6% on spiny dendritic shafts and 38.4% on aspiny shafts). That is, the majority of SS target dendritic shafts, and a small percentage of SS were established on spine heads (7.1%) and spine necks (0.9%; Table 2; Extended Data Table 2-1).

Therefore, we evaluated whether AS and SS had a preference for spines (heads and necks) or dendritic shafts. To evaluate this possibility, a 2×4 contingency table was created showing both types of synapses against the type of their postsynaptic target (Extended Data Table 2-2). The null hypothesis of this χ^2 test was “ H_0 : type of synapse and type of postsynaptic target are independent”; χ^2 test demonstrated that the null hypothesis must be rejected (Pearson- $\chi^2 = 117.06$; $df = 3$; $p < 0.0001$), showing that there is an association between the type of synapses and the type of postsynaptic target. To determine which values in this test are driving this significance, 2×2 contingency tables were created (Extended Data Table 2-3). Since the observed values for SS in spine necks were <5 , these data were discarded (Bewick et al., 2004). In the 2×2 tables, the expected counts of AS and SS on spine heads, aspiny dendritic shafts and spiny dendritic shafts were calculated from the marginal totals. In general, for any contingency table, the expected frequency for a cell in the i th row and the j th column is $E_{ij} = T_{i.}T_{.j}/T$ where $T_{i.}$ is the marginal total for the i th row, $T_{.j}$ is the marginal total for the j th column, and T is the total number of observations. χ^2 tests were applied to these tables and

the null hypothesis (“ H_0 : type of synapse and type of postsynaptic target are independent”) was rejected; that is, there is an association between the type of synapse and the type of postsynaptic target. We found that AS had a significant preference for spine heads: 99.0% of AS and only 1.0% of SS were established on spine heads (χ^2 , $p < 0.0001$). By contrast, the SS showed a significant preference for dendritic shafts (χ^2 , $p < 0.0001$), both in aspiny dendritic shafts (receiving 86.6% AS and 13.4% SS) and spiny dendritic shafts (receiving 82.7% AS and 17.3% SS). Since the overall proportion of synapses on spines versus synapses on shafts was ~56:44, each synaptic type, AS and SS, had a clear preference for a particular postsynaptic target.

When we differentiated the synapses according to their type (AS or SS) and their postsynaptic target (spine heads, spine necks or dendritic shafts), we found that 54.7% were AS targeting spine heads, 37.4% were AS on dendritic shafts, 6.8% corresponded to SS on dendritic shafts, and 0.5% were SS on spine heads (Fig. 4). However, few synapses targeted spine necks (0.5% of AS and 0.1% of SS; Fig. 4).

We also determined the proportion of single or multiple synapses per spine head and found that the majority of synapses were single AS (94.5%). The remaining 5.5% were multiple synapses, which were found on the spine heads in different combinations as follows: 3.6% comprised two AS, with 1.9% comprising one AS and one SS (Fig. 5).

Furthermore, we examined the possible relationship between the postsynaptic target of the synapses and their synaptic size. This study was performed by examining the area, perimeter and curvature of the SAS from each AS and SS. In the case of the AS, the mean SAS curvature of synapses targeting spine heads was significantly higher than in synapses targeting dendritic shafts (KW, $p < 0.001$; Table 3; Fig. 6). In the case of SS, the number of synapses was considered too low to perform a robust statistical analysis.

AD

We examined the postsynaptic targets of 1153 AS and 102 SS that were unambiguously identified. The study of the preferred postsynaptic target revealed that 50.2% of AS were established on spine heads and 0.7% on spine necks. The remaining AS (49.1%) were established on dendritic shafts: 28.0% on aspiny dendritic shafts and

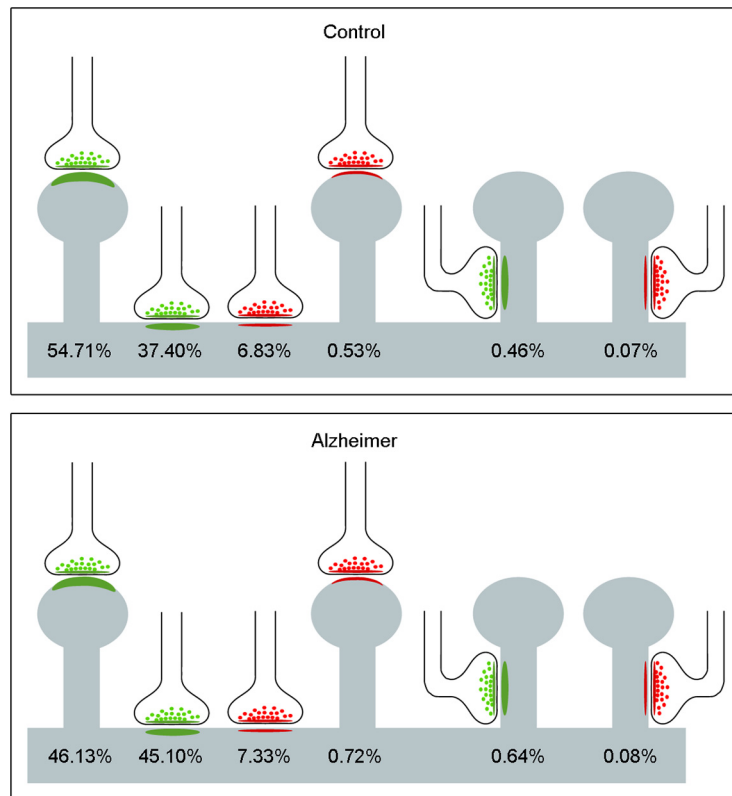


Figure 4. Representation of the distribution of AS (green) and SS (red) on spines and dendritic shafts. Percentages of each type are indicated. Synapses on spines have been sub-classified into those that are established on the head of the spine and those that are established on the neck. AS have been represented in green and SS in red. Control cases are represented on the top and AD patients on the bottom.

21.1% on spiny shafts (Table 2; Extended Data Table 2-1). In these AD samples, SS also showed a clearly different preference pattern: 90.2% of SS targeted dendritic shafts (49.0% on spiny dendritic shafts and 41.2% on aspiny shafts). A small percentage of SS were established on

spine heads (8.8%) and spine necks (1.0%; Table 2; Extended Data Table 2-1).

To evaluate possible preference of AS and SS for spines or dendritic shafts in AD samples, the same analysis performed in control cases was used: χ^2 test in 2×4 and 2×2 contingency tables. We found that AS had a significant preference for spine heads: 98.5% of AS versus only 1.5% of SS (χ^2 , $p < 0.0001$). By contrast, the SS showed a significant preference for dendritic shafts (χ^2 , $p < 0.0001$), with 82.9% of AS and 17.1% of SS on dendritic spiny shafts, and 88.5% of AS and 11.5% of SS on aspiny dendritic shafts.

Analysis of synapses according to their type (AS or SS) and their postsynaptic target (spine heads, spine necks and dendritic shafts) showed that, in AD samples, 46.1% of the synapses were AS targeting spine heads, 45.1% were AS on dendritic shafts, 7.3% corresponded to SS located on dendritic shafts and 0.7% to SS on spines (Fig. 4). Similar to observations with the control cases, there were few synapses targeting spine necks (0.7% for AS and 0.1% for SS; Fig. 4).

The presence of single or multiple synapses per spine head was also examined. The majority of synapses established on spine heads were single AS (90.6%) and the least frequent type was single SS (0.2%) on a spine head. The remaining 9.2% were multiple synapses, which were found on the spine heads in different combinations, as follows (Fig. 5): 6.5% comprised two AS, with 1.7% comprising one AS and one SS, and 1.0% comprising two AS and one SS (not shown).

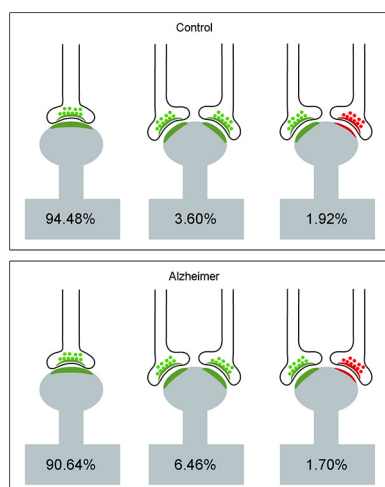


Figure 5. Schematic representation of single and multiple synapses on dendritic spine heads. Percentages of each type are indicated. Synapses on the necks and other combinations that were rarely found ($<1\%$) have not been represented. AS have been represented in green and SS in red. Control cases are represented on the top and AD patients on the bottom.

Table 3. Data regarding area (nm²), perimeter (nm), and curvature (ratio) of the SAS from synapses on spines and dendritic shafts in control cases and AD patients

Group	Postsynaptic structure	Type of synapse	Area of SAS (nm ² ; mean \pm SEM)	Perimeter of SAS (nm; mean \pm SEM)	Curvature of SAS (mean \pm SEM)
Control	Spine heads	AS	14,5013 \pm 4103	1877 \pm 38	0.05 \pm 0.001
		SS	81,295 \pm 12,011	1380 \pm 138	0.05 \pm 0.010
	Spine necks	AS	82,219 \pm 23,461	1413 \pm 255	0.04 \pm 0.004
		SS	19,199 \pm 0	627.7 \pm 0	0.04 \pm 0
	Dendritic shafts	AS	115,703 \pm 2845	1613 \pm 24	0.04 \pm 0.001
		SS	76,129 \pm 4299	1442 \pm 51	0.06 \pm 0.005
Alzheimer	Spine heads	AS	135,310 \pm 4762	1815 \pm 47	0.05 \pm 0.002
		SS	50,292 \pm 12,137	1014 \pm 128	0.06 \pm 0.010
	Spine necks	AS	61,658 \pm 13,211	1150 \pm 119	0.05 \pm 0.005
		SS	55,339 \pm 0	1269 \pm 0	0.11 \pm 0
	Dendritic shafts	AS	119,272 \pm 3335	1638 \pm 32	0.04 \pm 0.001
		SS	78,687 \pm 5885	1280 \pm 50	0.06 \pm 0.005

All data are corrected for shrinkage factor. SEM: standard error of the mean.

In AD samples, we also evaluated whether the postsynaptic target was related to the size of the synaptic junctions. For this purpose, we examined the area, perimeter and curvature ratio of the SAS from each AS and SS. In the case of the AS, the mean SAS curvature ratio of

synapses targeting spine heads was significantly higher than that found in synapses targeting dendritic shafts (KW, $p < 0.001$; Table 3; Fig. 6). In the case of SS, the number of these synapses was not sufficient to perform a robust statistical analysis.

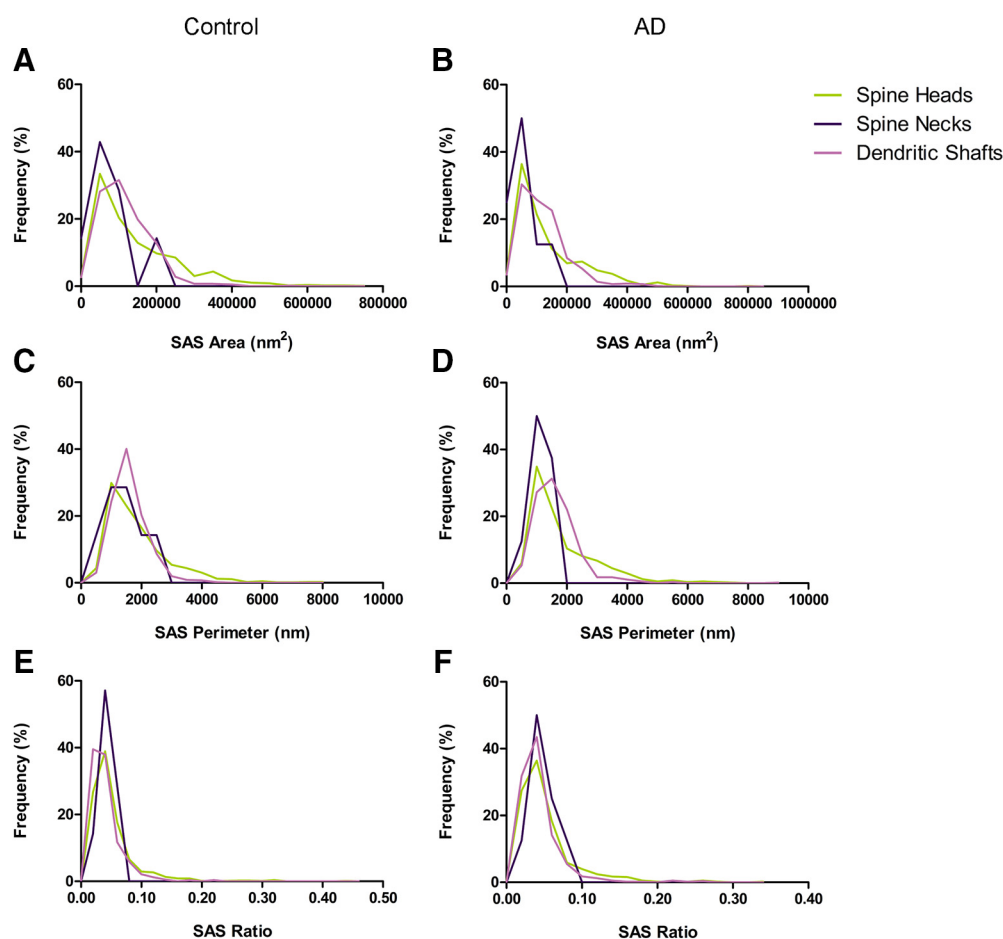


Figure 6. Frequency histograms of the SAS area (A, B), perimeter (C, D), and curvature (E, F) of AS targeting spine heads, spine necks, and dendritic shafts from control cases (A, C, E) and from AD patients (B, D, F). The mean SAS curvature ratio of synapses targeting spine heads was significantly higher than in synapses targeting dendritic shafts (KW, $p < 0.0001$), both in control cases and AD patients.

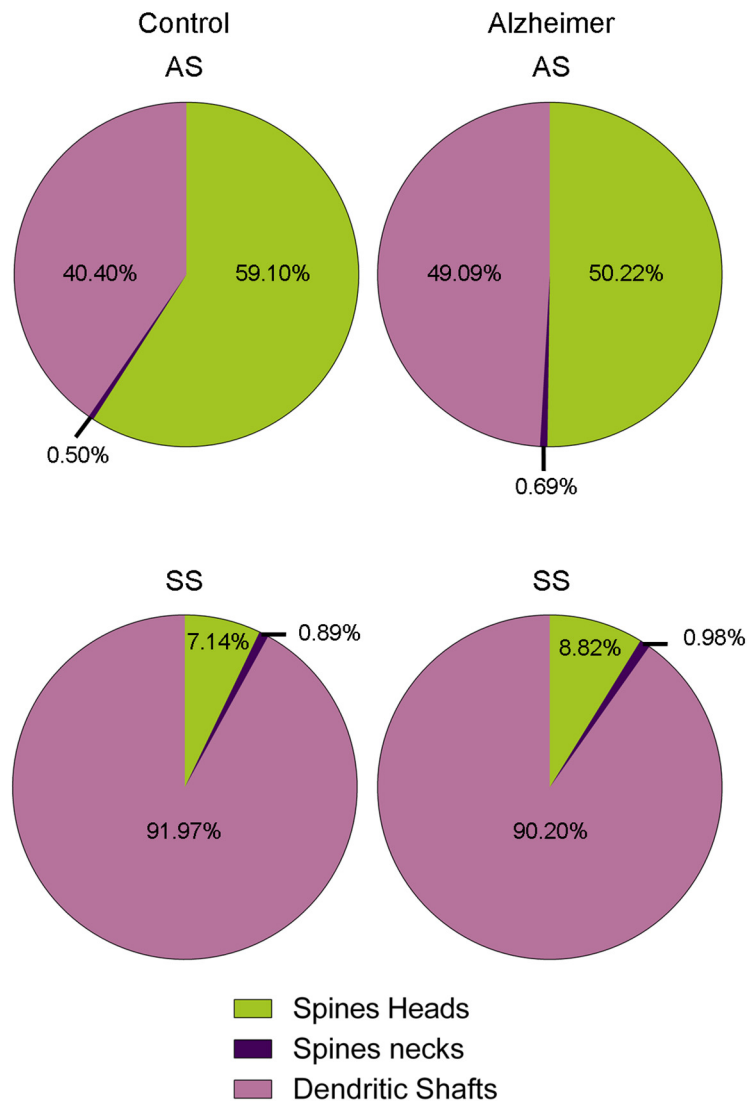


Figure 7. Proportion of AS and SS on spines and dendritic shafts in control and AD cases. In AD patients, there is a significantly lower number of AS targeting spine heads (χ^2 , $p < 0.001$) and a significantly higher number of AS targeting dendritic shafts (χ^2 , $p < 0.001$). Data from SS shows no apparent differences between groups.

The analysis of SAS features to compare between control and AD samples showed no differences between groups (MW, $p > 0.05$). Likewise, frequency distribution analysis of SAS did not reveal significant differences (KS, $p > 0.01$; Fig. 6).

To evaluate possible differences in the postsynaptic targets in AD patients compared to control cases, χ^2 tests in 2×4 and 2×2 contingency tables were performed. In this case, contingency tables considered both control and AD samples against the type of postsynaptic target. For AS, in AD patients there were significantly less synapses targeting spine heads compared to control cases (χ^2 , $p < 0.001$; Fig. 7). By contrast, we observed that significantly more synapses targeted dendritic shafts in AD patients (χ^2 , $p < 0.001$; Fig. 7). No differences were found regarding synapses targeting spine necks (χ^2 , $p = 0.7099$; Fig. 7). Concerning SS, the number of synapses examined was not sufficient to perform a robust statistical analysis.

The shape and size of the synaptic junctions

Regarding the synaptic shape, synapses were categorized into four main types according to Santuy et al. (2018a): macular, perforated, horseshoe-shaped, and fragmented synapses. Briefly, macular synapses presented continuous disk-shaped PSD; those with holes in the PSDs were classified as perforated synapses; synapses with tortuous horseshoe-shaped perimeters with an indentation were called “horseshoe-shaped”; and irregular small disk-shaped PSDs with no connection between them were considered as “fragmented” synapses (Fig. 1A).

Control

In control cases, 2561 AS were identified and fully reconstructed in 3D. The majority of these were macular (83.8%), followed by perforated synapses (11.8%). Relatively few were horseshoe-shaped (3.8%), and much fewer still were fragmented synapses (0.6%; Table 4;

Table 4. Proportion of the different shapes of synaptic junctions in control and AD patients

Group	Type of synapse	Macular synapses	Perforated synapses	Horseshoe-shaped synapses	Fragmented synapses	Total synapses
Control	AS	83.8% (2145)	11.8% (302)	3.8% (98)	0.6% (16)	100% (2561)
	SS	83.5% (106)	3.9% (5)	12.6% (16)	0.0% (0)	100% (127)
Alzheimer	AS	81.4% (1558)	11.5% (221)	5.3% (101)	1.8% (35)	100% (1915)
	SS	92.5% (110)	6.7% (8)	0.8% (1)	0.0% (0)	100% (119)

Data are given as percentages with the absolute number of synapses studied in parentheses. Data for each individual case are represented in Table 4-1.

Extended Data Table 4-1). Regarding SS, we identified and fully reconstructed in 3D a total of 127 synapses. The majority were macular-shaped (83.5%), followed by horseshoe-shaped (12.6%). The least frequent type was the perforated (3.9%) and no fragmented SS were found (Table 4; Extended Data Table 4-1).

To evaluate possible association of AS and SS regarding the synaptic shape, again χ^2 tests in 2×4 and 2×2 contingency tables were created, considering both types of synapses against the morphological synaptic type. The null hypotheses of these χ^2 tests were “ H_0 : type of synapse and morphological synaptic type are independent.” We found that 95.3% of macular synapses were AS and 4.7% were SS. This proportion was slightly different in perforated synapses (98.4% AS and 1.6% SS), but in the case of horseshoe-shaped synapses, the proportion of AS was significantly lower (86.0% were AS and 14% SS; χ^2 , $p < 0.0001$), indicating that the horseshoe-shaped synapses were more frequent among SS than AS. Regarding the fragmented synapses, 100% were AS (Fig. 1C).

We also determined whether the shape of the synapses was associated with differences in their size. For this purpose, we examined the area, perimeter and curvature ratio of the SAS from each AS and SS. In the case of the AS, the mean SAS area, perimeter and curvature ratio of macular synapses were all significantly smaller than in

perforated, horseshoe-shaped and fragmented synapses (KW, $p < 0.0001$; Table 5; Fig. 8). Although we observed the same tendency in the case of SS (smaller macular synapses than perforated and horseshoe-shaped synapses), only five perforated synapses and 16 horseshoe-shaped ones were found, and therefore, statistical analysis was not applied.

AD

In AD patients, a total of 1915 AS were identified and fully 3D reconstructed. The majority of these synapses were macular-shaped (81.4%), followed by perforated synapses (11.5%), horseshoe-shaped (5.3%), and only 1.8% were fragmented synapses. Concerning SS, we identified and fully 3D reconstructed a total of 119 synapses. The majority were macular (92.5%), followed by perforated (6.7%). The least frequent type was the horseshoe-shaped (0.8%), and similar to the observations with control cases, fragmented SS were not found in AD patients (Table 4; Extended Data Table 4-1).

As occurred in the control cases, we found that 93.4% of macular synapses were AS and 6.6% were SS. This proportion was slightly different in perforated synapses (96.5% AS and 3.5% SS) and horseshoe-shaped synapses (99.0% AS and 1.0% SS). Regarding the fragmented synapses, 100% were AS (Fig. 1D).

Table 5. Data regarding area (nm²), perimeter (nm), and curvature (ratio) of the SAS of macular, perforated, horseshoe-shaped, and fragmented synapses in control cases and AD patients

Group	Shape of synapses	Type of synapse	Area of SAS (nm ² ; mean \pm SEM)	Perimeter of SAS (nm; mean \pm SEM)	Curvature of SAS (mean \pm SEM)
Control	Macular	AS	88,272 \pm 1283	1352 \pm 11	0.04 \pm 0.001
		SS	70,960 \pm 3764	1306 \pm 40	0.05 \pm 0.005
	Perforated	AS	264,960 \pm 6606	2914 \pm 58	0.07 \pm 0.003
		SS	108,320 \pm 22,066	2080 \pm 279	0.07 \pm 0.016
	Horseshoe-shaped	AS	262,251 \pm 13,757	3725 \pm 163	0.09 \pm 0.007
		SS	88,466 \pm 13204	1876 \pm 153	0.06 \pm 0.011
	Fragmented	AS	360,245 \pm 34,068	3735 \pm 435	0.14 \pm 0.025
		SS	-	-	-
Alzheimer	Macular	AS	91,162 \pm 1689	1367 \pm 14	0.04 \pm 0.001
		SS	59,436 \pm 3156	1224 \pm 42	0.06 \pm 0.005
	Perforated	AS	259,540 \pm 7942	2879 \pm 73	0.07 \pm 0.003
		SS	123,147 \pm 14,857	1776 \pm 129	0.03 \pm 0.006
	Horseshoe-shaped	AS	237,778 \pm 9524	3568 \pm 127	0.08 \pm 0.006
		SS	115,312 \pm 0.0	2431 \pm 0	0.07 \pm 0.000
	Fragmented	AS	303,922 \pm 21,783	2985 \pm 210	0.13 \pm 0.014
		SS	-	-	-

All data are corrected for shrinkage factor. SEM: standard error of the mean.

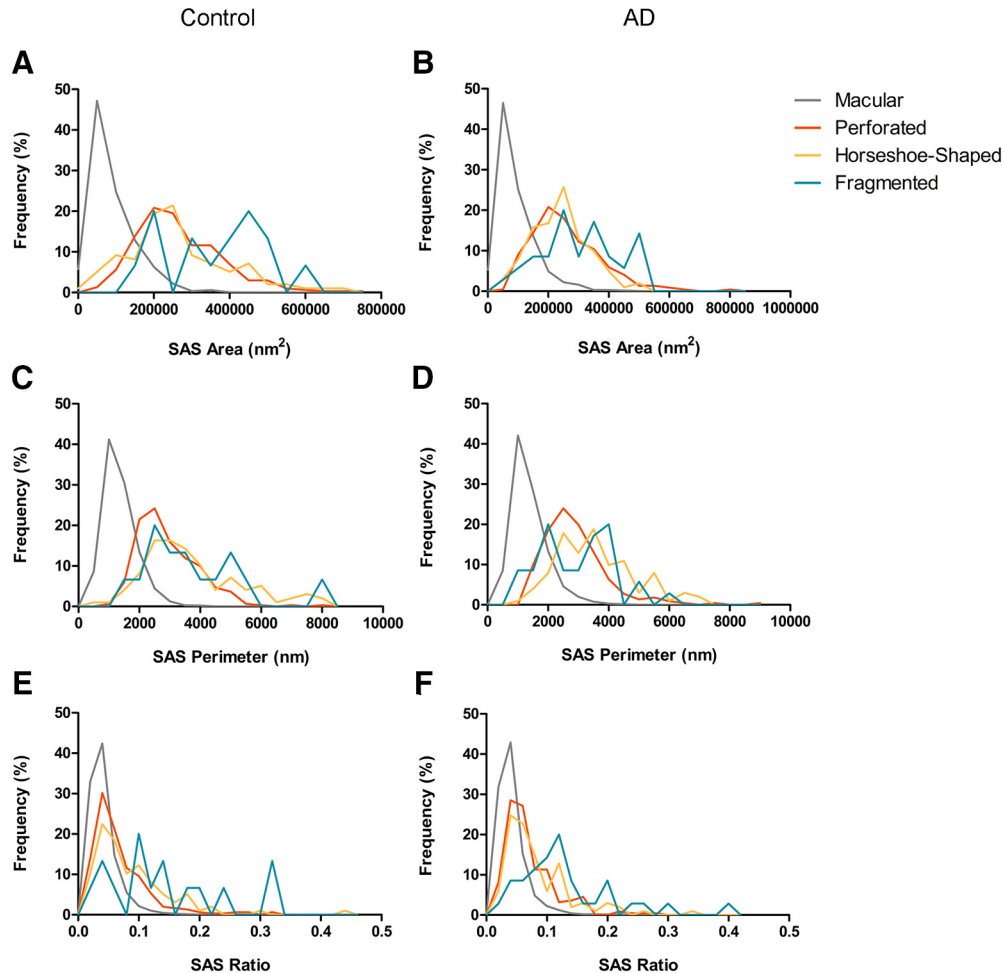


Figure 8. Frequency histograms of the SAS area (**A**, **B**), perimeter (**C**, **D**), and curvature (**E**, **F**) of macular, perforated, horseshoe-shaped and segmented AS from control cases (**A**, **C**, **E**) and from AD patients (**B**, **D**, **F**). The mean SAS area, perimeter and curvature of macular synapses was significantly smaller than in perforated, horseshoe-shaped and segmented synapses (KW, $p < 0.0001$), both in control cases and AD patients.

To evaluate possible differences in the proportion of the synaptic shapes between control cases and AD patients, χ^2 tests in 2×4 and 2×2 contingency tables were performed. In this case, contingency tables considered both control and AD samples against the morphological synaptic type. For AS the results indicated that, in AD patients, fragmented synapses were more frequent than in control cases (χ^2 , $p < 0.001$). This difference was not significant regarding macular, perforated and horseshoe synapses (χ^2 , $p > 0.01$; Fig. 1B), but we observed a slightly higher number in horseshoe synapses (χ^2 , $p = 0.024$) and slightly fewer number in macular synapses (χ^2 , $p = 0.039$). Regarding SS, the number of these synapses was not sufficient to perform a robust statistical analysis.

Moreover, we determined whether the shape of the synapses was associated with differences in their size. The area, perimeter and curvature of the SAS from each of the AS and SS were examined. In the case of the AS, the mean SAS area, perimeter and curvature of macular synapses were, as occurred in control cases, significantly smaller than in perforated, horseshoe-shaped and frag-

mented synapses (KW, $p < 0.0001$; Table 5; Fig. 8). Although we observed the same tendency in the case of SS (smaller macular synapses than perforated and horseshoe-shaped synapses), the number of these synapses was not sufficient to perform a robust statistical analysis. SAS features of AS such as the area, perimeter and the curvature were compared between the two groups, with no significant differences observed between control cases and AD patients (MW, $p > 0.05$). Likewise, frequency distribution analysis did not reveal significant differences (KS, $p > 0.01$).

Discussion

This study provides the following findings: first, both in control cases and AD patients, AS had a significant preference for spine heads, while the preference of SS was for dendritic shafts. However, in AD patients we observed a lower percentage of synapses targeting spine heads. Second, regarding the shape of synapses, in control and AD samples, the vast majority of synapses had a macular shape (83.8% for AS and 83.5% for SS control; 81.4% for AS and 92.5% for SS AD). Third, in AD patients, we

Table 6. Summary of the data from the studies of the pattern of synaptic distribution

	Human TEC	Striate cortex (area 17) of the monkey ¹		Visual cortex of the adult cat ²		Somatosensory cortex of the adult rat (P60) ³
	Layer II	Layer II–III	All layers	Layer II	All layers	All layers
AS on spines	55.2%	54.9%	53.0%	71.2%	66.4%	73.0%
AS on dendritic shafts	37.4%	27.7%	30.0%	13.3%	17.6%	12.9%
SS on dendritic shafts	6.7%	11.4%	11.9%	10.8%	10.6%	9.3%
SS on spines	0.61%	6.0%	5.1%	4.7%	5.3%	4.8%

Data are given as percentages. Data were taken from: ¹Beaulieu et al., 1992; ²Beaulieu and Colonnier (1985); ³Micheva and Beaulieu (1996).

observed a higher percentage of fragmented AS than in control cases.

Distribution of postsynaptic targets

Synaptic targets in control cases

The analysis of the preferred postsynaptic target revealed that the vast majority of AS were established on spines, whereas, in the case of SS, the vast majority were on dendritic shafts. If we take into account the synaptic type (AS or SS) and its postsynaptic target, we found that in control cases 54.7% of synapses were AS targeting spine heads, 37.4% were AS on dendritic shafts, 6.8% were SS located on dendritic shafts, and 0.5% were SS on spine heads. Very few synapses targeted spine necks (0.5% of AS and 0.1% of SS).

Since there are no similar studies performed in the human cerebral cortex, we compared our results with EM studies performed in the neuropil of other species and cortical regions (Table 6; Beaulieu and Colonnier, 1985; Beaulieu et al., 1992; Micheva and Beaulieu, 1996). These studies include data from the monkey striate cortex, the cat visual cortex, and the rat barrel cortex. As summarized in Table 6, there is a general pattern in all cortical areas and species: AS located on spines predominate, followed by AS located on dendritic shafts, SS located on dendritic shafts, and, finally, SS located on spines. Taking into account the considerable differences in the functional and structural features between the different cortical areas and species (DeFelipe, 2011), the similarity of this general pattern of synaptic distribution is remarkable. Nevertheless, there are important differences in the percentage for each category, which could be attributed to species specialization of the different cortical areas examined. For example, Layer II of the human TEC had the lowest percentage of AS on spines, although this percentage was similar to that found in layer 2/3 of the monkey striate cortex. However, the proportions of AS on shafts and SS on spines were largest and lowest, respectively, in the human TEC (Table 6). Nevertheless, we cannot rule out the possibility that the differences in the percentages observed in the present study and the above mentioned publications in experimental animals could also be explained, at least in part, by the different methodological approaches used to identify the postsynaptic targets; we used the gold standard method, namely full reconstructions of the synapses, rather than the partial reconstructions conducted in other publications.

Synaptic targets in AD

In the AD samples, the study of the preferred postsynaptic target showed that, as observed with control cases, the majority of AS were established on spines (with 50.2% targeting spine heads and 0.7% targeting spine necks). The remaining AS were established on dendritic shafts (28.0% of AS on aspiny dendritic shafts and 21.1% of AS on spiny shafts). However, the majority of SS target dendritic shafts (49.0% on spiny dendritic shafts and 41.2% on aspiny shafts), and a small percentage of SS were established on spine heads (8.8%) and spine necks (1.0%).

Comparison of the postsynaptic targets in AD patients and control cases revealed a significant reduction in the number of synapses targeting spine heads in AD patients. This reduction is probably related to the changes in number and morphology of spines that occur in AD. For example, in the vicinity of amyloid plaques in the cerebral cortex of mouse models of AD, as well as in tissue from AD patients, spines are lost or undergo a variety of morphological changes (Spires-Jones et al., 2007; Knafo et al., 2009; Tackenberg et al., 2009; Merino-Serrais et al., 2011; Pozueta et al., 2013; Llorens-Martín et al., 2014; Zou et al., 2015). Furthermore, some studies have observed loss and morphological changes of spines in tau transgenic mice and AD patients, related to the presence of pretangles or neurofibrillary tangles in pyramidal neurons (Tackenberg et al., 2009; Merino-Serrais et al., 2013; Pozueta et al., 2013). Thus, both A β -plaques in the neuropil and the intracellular neurofibrillary tangles within pyramidal cells induce alterations in spines. Since the majority of the synapses a pyramidal cell receives are on spines and they represent the vast majority of AS synapses (DeFelipe and Fariñas, 1992), the loss of spines, and, therefore, the loss of synapses, has been proposed as the structural basis of pathogenesis in AD and in other neurodegenerative diseases, such as Huntington's disease, and amyotrophic lateral sclerosis-associated dementia (Herms and Dorostkar, 2016).

Despite the fact that we found a significantly lower number of synapses targeting spine heads in AD patients, it is important to note that there was a high interindividual variability (Extended Data Table 2-1). Two AD patients (IF6, VK11), who had the lowest Braak/CERAD stage (IIIIV/A), showed values of synapses targeting spine heads similar to control cases. By contrast, one AD patient (VK22) classified with the highest Braak/CERAD stage

(V/C) presented the lowest number of synapses targeting spine heads. Therefore, the number of synapses targeting spine heads might be modified by differences in the disease progression. By contrast, one AD patient (IF1), classified as Braak/CERAD stage IV/B, showed values of synapses targeting spine heads similar to control cases. Since this patient apparently did not display cognitive impairment, it is possible that this particular case may represent a prodementia stage of AD with no impairment of spines. This variability could not be explained by technical effects, since postmortem delays were all similar and we used the same methodological procedures. However, others factors such as gender or aging could explain the variability among cases, since these factors may influence the number of synapses (Alonso-Nanclares et al., 2008; Peters and Kemper, 2012).

The shape and size of the synaptic junctions: controls versus AD

It is not only the number of spines that is essential in terms of maintenance of synaptic connectivity and plasticity; spine morphology is also critical from a functional point of view (Yuste, 2010; Herms and Dorostkar, 2016). The spine head volume has been related to the area of the PSD, which has in turn been related to the number of postsynaptic receptors (Nusser et al., 1998) and the probability of neurotransmitter release (Arellano et al., 2007; Montes et al., 2015). Regarding the molecular composition of the PSD, the larger the synapse, the higher the actual number of AMPA receptors, whereas a higher concentration of NMDA receptors has been found in smaller synapses (Kharazia and Weinberg, 1999). In the present study, no changes in any of the PSD size parameters (SAS area and perimeter) were found in AD samples. However, the protein composition of human synapses is highly complex (Grant, 2012) and we cannot rule out changes in the composition and number of postsynaptic receptors and other elements of the postsynaptic signaling complexes in Layer II of the TEC in AD patients. Further studies of the human synapse proteome in the TEC would be necessary to better understand the synaptic changes found in this cortical region.

In both control and AD cases, synaptic junctions were categorized into four main types depending on their shape: macular, perforated, horseshoe-shaped and fragmented synapses.

Control

In general, the vast majority of both AS and SS had a macular shape; followed far behind, the second most common type was perforated synapses in the case of AS, or horseshoe-shaped synapses in the case of SS. Fragmented synapses were found in low numbers and all of them were AS. Regarding the average size of synapses, macular synapses were smaller than perforated, horseshoe-shaped and fragmented synapses. Unfortunately, since there are no studies about the 3D synaptic morphology in the human neocortex, our results cannot be compared with previous studies performed in the TEC or in any other human cortical region. These

results are similar to previous studies on synaptic shape and size performed in the juvenile rat somatosensory cortex (Santuy et al., 2018a).

Although we do not know how morphological synaptic changes affect synaptic function, some studies have related them to an increase in the synaptic transmission efficiency, because the remodeling process involves the insertion of new receptors in the postsynaptic membrane (Lüscher et al., 2000). Moreover, in response to synaptic activity, receptors can be incorporated into the PSD either by endosomal pathways or by lateral diffusion from the extrasynaptic membrane zone (Kneussel and Hausrat, 2016). Under normal conditions, the macular synapses had the capacity to become larger by progressively adopting a more tortuous perimeter with perforations and indentations (Geinisman et al., 1987, 1991, 1992a,b). So, synapses may become larger and more complex by a remodeling process involving the incorporation of receptors into the postsynaptic membrane. Accordingly, some studies have reported higher immunoreactivity for glutamate receptors (AMPA and NMDA) in perforated synapses than in non-perforated ones (Ganeshina et al., 2004a,b). Models to study how variations in size of synaptic junctions are related to characteristics such as release probability of neurotransmitter and density of postsynaptic AMPA receptors suggest that large synapses with more number of postsynaptic receptors would produce stronger and more homogeneous responses, while small synapses with fewer receptors would produce weaker and much more variable responses (Montes et al., 2015).

Furthermore, it has been postulated that fragmented synapses are specialized synapses which would lead to a greater synaptic response than in the case of synapses that only have a single PSD (Geinisman et al., 1987; Ganeshina et al., 2004a). Several studies have found an increase in the number of fragmented synapses resulting from the turnover of original synapses in the dental gyrus and CA1 of the rat hippocampus after LTP or kindling stimulation (Geinisman et al., 1991, 1992a,b, 1993; Toni et al., 2001). In this process, a continuous disk-shaped PSD synapse (macular) enlarges with the formation of one or more holes in its PSD, becoming a horseshoe shape before finally separating into different PSDs with no connections between them (Geinisman et al., 1987). Thus, fragmented synapses could be structural intermediates in various forms of synaptic dynamics and their increase in their number could be responsible for the enhancement of synaptic efficacy that is typical of LTP and kindling. Finally, if perforated, horseshoe-shaped and fragmented synapses represent different dynamic functional stages, and the percentage of these synapses is relatively low, it follows that dynamic synaptic changes must be of relatively little importance.

However, we should keep in mind that, in the TEC, there are billions of synapses (510×10^6 synapses per mm^3 ; Domínguez-Álvarez et al., 2018). Thus, there are millions of synapses with these different shapes, which could in fact be interpreted as a relatively high rate of synaptic dynamism.

AD

In AD cases, the vast majority of both AS and SS were macular, followed by perforated, horseshoe-shaped and fragmented synapses. In the case of SS, the percentages of perforated and horseshoe-shaped synapses were lower than for AS, and fragmented synapses were not found.

When we compared the proportion of the different synaptic shapes between control cases and AD patients, we found that AS fragmented synapses were more frequent in AD patients than in control cases. This difference was not found in macular, perforated or horseshoe-shaped synapses, although a slightly lower proportion of macular synapses and a slightly higher proportion of horseshoe synapses were found in AD patients.

In our AD samples, we also determined whether the shape of the synapses was related to the synaptic size (area, perimeter and curvature of the SAS). We observed that synapses in AD samples had similar morphological features to those observed in control cases. In the case of the AS, the area, perimeter and curvature of macular synapses were significantly smaller than in perforated, horseshoe-shaped, and fragmented synapses. Moreover, regarding these synaptic features, there were no significant differences between control and AD patients, as previously reported in other cortical regions using conventional transmission EM (Scheff and Price, 2006; Scheff et al., 1993).

Since an increase in the number of fragmented synapses has been related to potentiation of the synaptic efficacy (Geinisman et al., 1991, 1992a,b, 1993; Toni et al., 2001), the increased number of this type of synapse found in AD patients could be due to the activation of compensatory mechanisms in response to the synaptic loss that occurs in this cortical region (Domínguez-Álvarez et al., 2018). Accordingly, a higher number of perforated synapses have been reported in several diseases and under certain experimental conditions, such as, e.g., after striatal dopamine depletion in the striatum of the rat (Anaya-Martínez et al., 2014). Recently, enhancement of physiologic synaptic activity during early stages of AD has been suggested as a compensatory response (Tampellini, 2015). Since the potentiation of synaptic activity may promote an increase in the proportion of fragmented synapses, we could hypothesize that the higher proportion of fragmented synapses found in AD patients could be a compensatory mechanism during the progression of this disease, which would end in the generation of more fragmented synapses. However, it could be possible that this kind of mechanism fails and synaptic activity would fall off. Moreover, as fragmented synapses have more than one independent release site their formation could involve an increase in glutamate release, which may promote excitotoxicity and neuronal death (Anaya-Martínez et al., 2014).

Finally, although we analyzed only five control cases and five AD patients, it is important to keep in mind that, thanks to FIB/SEM technology, it was possible to obtain the first largest collection of 3D reconstructed synapses of the human brain, with thousands of synapses examined. This al-

lowed us to accurately determine their morphology and postsynaptic targets, constituting firm support for the evidence provided by the data presented. Nevertheless, further verification involving the examination of more cases with similar ages would be necessary to better understand the possible differences in the synaptic organization between controls and AD. As a final point, it is well established that there are differences in the microstructure of the cerebral cortex depending on the cortical area and layer (DeFelipe, 2011). Therefore, the data obtained in the present study probably cannot be extrapolated to other cortical regions. In other words, the synaptic organization must be examined separately in each particular region and for different ages and genders. This will make it possible to determine the similarities and differences in the synaptic organization between different cortical regions of the human brain.

Concluding remarks

In summary, this study provides evidence of a reduction in the number of synapses targeting spine heads in AD patients, in line with previous studies. The loss of spines, and, therefore, the loss of synapses, has been proposed as the structural basis of pathogenesis in AD. Besides, in this study we observed morphological synaptic alterations in TEC in AD patients. How these morphological changes could affect the synaptic function is unknown, but these changes have been related to modifications in the synaptic transmission efficiency. Thus, the increase in the number of fragmented synapses in AD patients could be due to the activation of compensatory mechanisms in response to the synaptic loss that occurs in this cortical region during the progression of the disease. However, it could be possible that this kind of mechanism fails and synaptic activity would fall off.

References

- Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Rodriguez JR, DeFelipe J (2008) Gender differences in human cortical synaptic density. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:14615–14619.
- Alzheimer's Association (2018) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 14:367–429.
- Anaya-Martínez V, Gutierrez-Valdez AL, Ordoñez-Librado JL, Montiel-Flores E, Sánchez-Betancourt J, Sánchez Vázquez del Mercado C, Reynoso-Erazo L, Tron-Alvarez R, Avila-Costa MR (2014) The presence of perforated synapses in the striatum after dopamine depletion, is this a sign of maladaptive brain plasticity? *Microscopy (Oxf)* 63:427–435.
- Arellano JI, Benavides-Piccione R, DeFelipe J, Yuste R (2007) Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci* 1:131–143.
- Arendt T (2009) Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 118:167–179.
- Beaulieu C, Colonnier M (1985) A laminar analysis of the number of round-asymmetrical and flat-symmetrical synapses on spines, dendritic trunks, and cell bodies in area 17 of the cat. *J Comp Neurol* 231:180–189.
- Beaulieu C, Kisvarday Z, Somogyi P, Cynader M, Cowey A (1992) Quantitative distribution of GABA-immunopositive and immunonegative neurons and synapses in the monkey striate cortex (area 17). *Cereb Cortex* 2:295–309.
- Bewick V, Cheek L, Ball J (2004) Statistics review 8: qualitative data-tests of association. *Crit Care* 8:46–53.
- Blazquez-Llorca L, Merchán-Pérez Á, Rodríguez JR, Gascón J, DeFelipe J (2013) FIB/SEM technology and Alzheimer's disease:

- three-dimensional analysis of human cortical synapses. *J Alzheimers Dis* 34:995–1013.
- Braak H, Braak E (1985) On areas of transition between entorhinal allocortex and temporal isocortex in the human brain. Normal morphology and lamina-specific pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 68:325–332.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239–259.
- Braak H, Braak E, Yilmazer D, Bohl J, Braak H, Braak E (1996) Topical review: functional anatomy of human hippocampal formation and related structures. *J Child Neurol* 11:265–275.
- Coleman P, Federoff H, Kurlan R (2004) A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology* 63:1155–1162.
- Colonnier M (1968) Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res* 9:268–287.
- DeFelipe J (2011) The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits and intellectual creativity. *Front Neuroanat* 5:29.
- DeFelipe J (2015) The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Front Neuroanat* 9:14.
- DeFelipe J, Fariñas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563–607.
- DeFelipe J, Fairén A (1993) A simple and reliable method for correlative light and electron microscopic studies. *J Histochem Cytochem* 41:769–772.
- Dickson DW, Crystal HA, Bevana C, Honer W, Vincent I, Davies P (1995) Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol Aging* 16:285–304.
- Dominguez-Álvarez M, Montero-Crespo M, Blazquez-Llorca L, Insausti R, Defelipe J (2018) Three-dimensional analysis of synapses in the transentorhinal cortex of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol Commun* 6:20.
- Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J (2015) Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathol* 130:1–19.
- Fauth M, Tetzlaff C (2016) Opposing effects of neuronal activity on structural plasticity. *Front Neuroanat* 10:75.
- Geinisman Y, Morrell F, de Toledo-Morrell L (1987) Axospinous synapses with segmented postsynaptic densities: a morphologically distinct synaptic subtype contributing to the number of profiles of 'perforated' synapses visualized in random sections. *Brain Res* 423:179–188.
- Geinisman Y, DeToledo-Morrell L, Morrell F (1991) Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities. *Brain Res* 566:77–88.
- Geinisman Y, de Toledo-Morrell L, Morrell F, Persina IS, Rossi M (1992a) Structural synaptic plasticity associated with the induction of long-term potentiation is preserved in the dentate gyrus of aged rats. *Hippocampus* 2:445–456.
- Geinisman Y, Morrell F, DeToledo-Morrell L (1992b) Increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities following hippocampal kindling. *Brain Res* 569:341–347.
- Geinisman Y, DeToledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE, Rossi M, Parshall RF (1993) Structural synaptic correlate of long-term potentiation: formation of axospinous synapses with multiple, completely partitioned transmission zones. *Hippocampus* 3:435–446.
- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geinisman Y (2004a) Synapses with a segmented, completely partitioned postsynaptic density express more AMPA receptors than other axospinous synaptic junctions. *Neurosci* 125:615–623.
- Ganeshina O, Berry RW, Petralia RS, Nicholson DA, Geinisman Y (2004b) Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. *J Comp Neurol* 468:86–95.
- Grant SG (2012) Synaptopathies: diseases of the synaptome. *Curr Opin Neurobiol* 22:522–529.
- Gray EG (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J Anat* 4:420–433.
- Henstridge CM, Pickett E, Spires-Jones TL (2016) Synaptic pathology: a shared mechanism in neurological disease. *Ageing Res Rev* 28:72–84.
- Herms J, Dorostkar MM (2016) Dendritic spine pathology in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pathol* 11:221–250.
- Insausti R, Muñoz-López M, Insausti AM, Artacho-Pérola E (2017) The human periallocortex: layer pattern in presubiculum, parasubiculum and entorhinal cortex. *Front Neuroanat* 11:84.
- Kharazia VN, Weinberg RJ (1999) Immunogold localization of AMPA and NMDA receptors in somatic sensory cortex of albino rat. *J Comp Neurol* 412:292–302.
- Knafo S, Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Ferrer I, DeFelipe J (2009) Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* 19:586–592.
- Kneussel M, Hausrat TJ (2016) Postsynaptic neurotransmitter receptor reserve pools for synaptic potentiation. *Trends Neurosci* 39:170–182.
- Llorens-Martín M, Blazquez-Llorca L, Benavides-Piccione R, Rabano A, Hernandez F, Avila J, DeFelipe J (2014) Selective alterations of neurons and circuits related to early memory loss in Alzheimer's disease. *Front Neuroanat* 8:38.
- Lüscher C, Nicoll RA, Malenka RC, Muller D (2000) Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic. *Nat Neurosci* 3:545–550.
- Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW Jr, Morris JC (2001) Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* 56:127–129.
- Merchán-Pérez A, Rodríguez JR, Alonso-Nanclares L, Schertel A, DeFelipe J (2009) Counting synapses using FIB/SEM microscopy: a true revolution for ultrastructural volume reconstruction. *Front Neuroanat* 3:18.
- Merino-Serrais P, Knafo S, Alonso-Nanclares L, Fernaud-Espinosa I, DeFelipe J (2011) Layer-Specific alterations to CA1 dendritic spines in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* 21:1037–1044.
- Merino-Serrais P, Benavides-Piccione R, Blazquez-Llorca L, Kastanaukaite A, Rabano A, Avila J, DeFelipe J (2013) The influence of phospho- τ on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Brain* 136:1913–1928.
- Micheva KD, Beaulieu C (1996) Quantitative aspects of synaptogenesis in the rat barrel field cortex with special reference to GABA circuitry. *J Comp Neurol* 373:340–354.
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L (1991) The consortium to establish a registry for AD (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41:479–486.
- Montes J, Peña JM, DeFelipe J, Herreras O, Merchán-Pérez A (2015) The influence of synaptic size on AMPA receptor activation: a Monte Carlo model. *PLoS One* 10:e0130924.
- Morales J, Alonso-Nanclares L, Rodríguez JR, DeFelipe J, Rodríguez Á, Merchán-Pérez Á (2011) Espina: a tool for the automated segmentation and counting of synapses in large stacks of electron microscopy images. *Front Neuroanat* 18:18.
- Morales J, Rodríguez A, Rodríguez JR, DeFelipe J, Merchán-Pérez A (2013) Characterization and extraction of the synaptic apposition surface for synaptic geometric analysis. *Front Neuroanat* 7:20.
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21:545–559.
- Peters A, Palay S (1996) The morphology of synapses. *J Neurocytol* 25:687–700.
- Peters A, Palay SL, Webster HD (1991) The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells, p 528. New York, NY: Oxford University Press.

- Peters A, Kemper T (2012) A review of the structural alterations in the cerebral hemispheres of the aging rhesus monkey. *Neurobiol Aging* 33:2357–2372.
- Pozueta J, Lefort R, Shelanski ML (2013) Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. *Neuroscience* 251:51–65.
- Rajmohan R, Reddy PH (2017) Amyloid-beta and phosphorylated tau accumulations cause abnormalities at synapses of Alzheimer's disease neurons. *J Alzheimers Dis* 57:975–999.
- Santuy A, Rodríguez J, Defelipe J, Merchán-Pérez A (2018a) Study of the size and shape of synapses in the juvenile rat somatosensory cortex with 3D electron microscopy. *eNeuro* 5:ENEURO.0377-17.2017.
- Santuy A, Rodríguez JR, DeFelipe J, Merchán-Pérez A (2018b) Volume electron microscopy of the distribution of synapses in the neuropil of the juvenile rat somatosensory cortex. *Brain Struct Funct* 223:77–90.
- Scheff SW, Price DA (2006) Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus. *J Alzheimers Dis* 9:101–115.
- Scheff SW, Sparks DL, Price DA (1993) Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 34:356–361.
- Selkoe DJ (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298:789–791.
- Sharpe D (2015) Your chi-square test is statistically significant: now what? *Pract Assess Res Eval* 20:2–10.
- Spires-Jones TL, Hyman B (2014) The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* 82:756–771.
- Spires-Jones TL, Meyer-Luehmann M, Osetek JD, Jones PB, Stern EA, Bacskai BJ, Hyman BT (2007) Impaired spine stability underlies plaque-related spine loss in an Alzheimer's disease mouse model. *Am J Pathol* 171:1304–1311.
- Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ (1997) Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:933–944.
- Tackenberg C, Ghori A, Brandt R (2009) Thin, stubby or mushroom: spine pathology in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 6:261–268.
- Tampellini D (2015) Synaptic activity and Alzheimer's disease: a critical update. *Front Neurosci* 9:423.
- Toni N, Buchs P, Nikonenko I, Povilaitite P, Parisi L, Muller D (2001) Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. *J Neurosci* 21:6245–6251.
- Wegner W, Mott AC, Grant SGN, Steffens H, Willig KI (2018) In vivo STED microscopy visualizes PSD95 sub-structures and morphological changes over several hours in the mouse visual cortex. *Sci Rep* 8:219.
- Yuste R (2010) Dendritic spines. Cambridge, MA: The MIT Press.
- Zou C, Montagna E, Shi Y, Peters F, Blazquez-Llorca L, Shi S, Filser S, Dorostkar MM, Herms J (2015) Intraneuronal APP and extracellular A β independently cause dendritic spine pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 129:909–920.
- Zhou L, McInnes J, Wierda K, Holt M, Herrmann AG, Jackson RJ, Wang YC, Swerts J, Beyens J, Miskiewicz K, Vilain S, Dewachter I, Moechars D, De Strooper B, Spires-Jones TL, De Wit J, Verstreken P (2017) Tau association with synaptic vesicles causes presynaptic dysfunction. *Nat Commun* 8:15295.